

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/48376 A2

(51) International Patent Classification⁷: **C12N 15/57**,
9/52, 1/20, 1/21, C12P 21/02 // (C12N 1/20, C12R 1:19)
(C12N 1/21, C12R 1:19)

(21) International Application Number: PCT/US01/47581

(22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/256,162 14 December 2000 (14.12.2000) US

(71) Applicant: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way,
South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(72) Inventor: **CHEN, Christina Yu-Ching**; 940 La Senda
Road, Hillsborough, CA 94010 (US).

(74) Agents: **HASAK, Janet, E.** et al.; Genentech, Inc., 1 DNA
Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

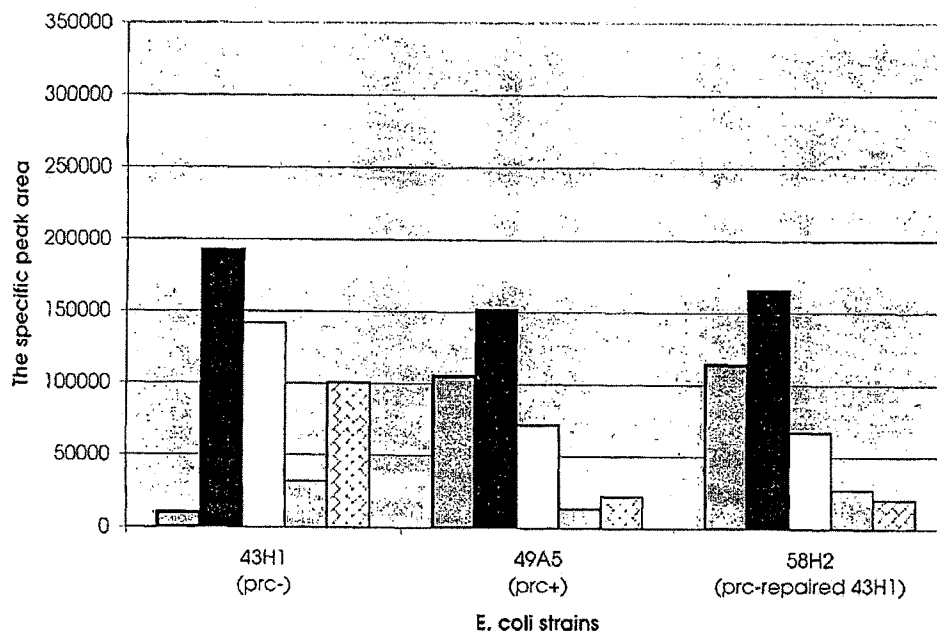
(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: BACTERIAL HOST STRAINS



(57) Abstract: An E. coli strain is described that is deficient in chromosomal *degP* and *prc* encoding protease DegP and Prc, respectively, and harbors a mutant *spr* gene that encodes a protein that suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *prc* mutants. Preferably, the strain comprises nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain, so that a heterologous polypeptide can be produced therefrom.

WO 02/48376 A2

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537262

(P2004-537262A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004. 12. 16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	Z N A 4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C 4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
//(C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-550091 (P2002-550091)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成13年12月7日 (2001. 12. 7)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月16日 (2003. 6. 16)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047581		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02002/048376		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成14年6月20日 (2002. 6. 20)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/256, 162	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成12年12月14日 (2000. 12. 14)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義敦
		(72) 発明者	チェン, クリスティーナ ユーチン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			10, ヒルズバラ, ラ センダ ロード
			940
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細菌性宿主株

(57) 【要約】

プロテアーゼである DegP 及び Prc を各々コードする染色体上の degP 及び prc に欠損を持ち、prc 突然変異を有する株によって示される成長表現型を抑制するタンパク質をコードする変異型 spr 遺伝子を持つ、大腸菌株について記載される。好ましくは、該株に対して異種のポリペプチドをコードする核酸を該株が含有し、その株から異種のポリペプチドが産生され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテアーゼである DegP 及び Prc を各々コードする染色体上の degP 及び prc に欠損を持ち、その遺伝子産物が prc 変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する変異 spr 遺伝子を持つ大腸菌株。

【請求項 2】

プロテアーゼ III をコードする染色体上の ptr3 又はプロテアーゼ ompT をコードする染色体上の ompT に欠損を持たない請求項 1 に記載の株。

【請求項 3】

その株に対して異種のポリペプチドをコードする核酸を有する請求項 1 に記載の株。

10

【請求項 4】

ポリペプチドがタンパク質分解に感受性である請求項 3 に記載の株。

【請求項 5】

ポリペプチドが真核生物のポリペプチドである請求項 3 に記載の株。

【請求項 6】

ポリペプチドが哺乳類のポリペプチドである請求項 5 に記載の株。

【請求項 7】

核酸で形質転換される請求項 3 に記載の株。

【請求項 8】

(a) プロテアーゼ Prc をコードする染色体上の prc に欠損を持ち、その遺伝子産物が prc 変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する変異 spr 遺伝子を有し、その株によって異種のポリペプチドをコードする核酸を有し、その核酸が発現されるように大腸菌株を培養し、(b) 該株から異種のポリペプチドを回収することを含むポリペプチドを生産する方法。

20

【請求項 9】

異種のポリペプチドがタンパク質分解に感受性である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

培養が発酵槽中で行われる請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

高い細胞密度の発酵条件下で培養が行われる請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

低い細胞密度の発酵条件下で培養が行われる請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

ポリペプチドが該株のペリプラズム又は培地から回収される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

ポリペプチドが抗体又は Apo2 リガンドである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

ポリペプチドが抗体である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

抗体がヒト化抗体である請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

抗体が完全長の抗体である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

抗体が抗-CD18、抗-VEGF、抗-組織因子、2C4、抗-Her-2、抗-CD20、抗-CD40、又は抗-CD11a 抗体である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

抗体が抗体断片である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

抗体断片が軽鎖を有する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

50

軽鎖が κ 軽鎖である請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

抗体断片が Fab、Fab'、Fab'2、又は Fab'2-ロイシンジッパー融合体である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

抗体断片が、ヒスチジン又はリジントグを持つか又は持たない、抗-CD18 Fab'2-ロイシンジッパー融合体、抗-組織因子 Fab'2-ロイシンジッパー融合体、又は抗-VEGF Fab である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

抗体断片が、抗-CD18 Fab'2-ロイシンジッパー融合体、6-ヒスチジントグを持つ抗-組織因子 Fab'2-ロイシンジッパー融合体、抗-VEGF Fab、6-ヒスチジントグを持つ抗-CD18 Fab'2-ロイシンジッパー融合体、及び 6-リジントグを持つ抗-CD18 Fab'2-ロイシンジッパー融合体である請求項 22 に記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、タンパク質分解性が欠如した細菌性宿主株を使用することに関する。より特別には、本発明は異種のポリペプチドの分解を回避し、かかるポリペプチドの収量を改善するような宿主株に関する。 20

【背景技術】

【0002】

2. 関連技術の説明

プロテアーゼ又はプロテアーゼの制御の遺伝子コントロールにおいて欠損を持つ大腸菌株は、既知のものである。例えば、Beckwith 及び Strauch, W088/05821、1988 年 8 月 11 日公開；Chaudhury 及び Smith, J. Bacteriol., 160:788-791 (1984)；Elish 等, J. Gen. Microbiol., 134:1355-1364 (1988)；Baneyx 及び Georgiou, "Expression of proteolytically sensitive polypeptides in Escherichia coli", In: Stability of Protein Pharmaceuticals, Vol. 3: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation, Ahern 及び Manning, eds. (Plenum Press, New York, 1992), p.69-108. 30

これらの株の幾つかは、タンパク質分解に感受性なタンパク質で、特に潜在的に医薬となるか又は商業的に重要なものを効率的に生産するための試みにおいて用いられてきた。米国特許第 5,508,192 号 (Georgiou 等) は、多くのプロテアーゼ欠損及び／又は熱ショックタンパク質欠損の細菌性宿主について記載している。このような宿主には、単一の、二重の、三重の、四重のプロテアーゼ欠損細菌及び rpoH 遺伝子にも変異を持つ単一のプロテアーゼ細菌が含まれる。プロテアーゼ欠損株の例には、degP, ompT, ptr3, 及び／又は prc(tsp), 及び大腸菌内で高力価の組換えタンパク質を産生することが報告される degP rpoH 株が含まれる。また、Park 等, Biotechnol. Prog., 15:164-167 (1999) も 2 つの細胞包膜プロテアーゼ (degP, prc) における欠損株 (HM114) は、より多くのプロテアーゼを欠損する他の株よりわずかに速く増殖し、より多くの融合タンパク質を産生した。彼らは、該株は pH-スタット、流加培養を用いて 29 時間で 47.86 g/L の乾燥重量の細胞にまで増殖したことを主張した。産生されたタンパク質は、タンパク質 A- β -ラクタマーゼ融合タンパク質で、その親株 KS272 から得られる活性より 30% 高い β -ラクタマーゼ活性を示した。 40

【0003】

Prc タンパク質は、ペリプラズム性ペニシリン結合タンパク質 3 (PBP3) のカルボキシル末端を切断するペリプラズムプロテアーゼとして、Hara 等, J. Bacteriol., 173:4799-4813 (1991) によって最初に単離された。その後、それは、非極性 C 末端を持つタンパク質を選択的に分解するプロテアーゼとして同定され、Tsp と改名された (Silber 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:295-299 (1992))。prc 遺伝子は 75-kDa タンパク質をコードするこ 50

とが示されたが、温度及び浸透圧の組合わされたショックからの細胞の保護に必要である (Hara等, 上掲)。C末端配列は基質選択性を決定するということが確認されている (Keiler等, Protein Sci., 4, :1507-1515 (1995))。切断量は基質タンパク質のC末端における残基又は官能基の同一性に対して感受性である。 δ カルボキシル基の存在は、非極性C末端配列を持つペプチドと極めて関連性を有するペプチドがprcによって効率的に切断されるかどうか決定する場合に重要である。

prcホモログは、多岐に渡る原核生物の集団において同定されており、幾つかのラン藻類 (Brand等, Plant Mol. Bio., 20:481-491 (1992); Shestakov等, J. Biol. Chem., 269:19354-19359 (1994))、淋菌 (Black等, J. Bacteriol., 177:1952-1958 (1995))、インフルエンザ菌 (Fleischmann等, Science, 269:496-512 (1995))、及びバルトネラ・バシリホルミス (GenBank登録番号L37094) が含まれる。Prcファミリータンパク質中のドメインは、レチノール結合タンパク質中のドメインと類似であり、疎水性基質に対するこれらのタンパク質中の結合ポケットを形成する共通の折り畳みドメインを示す (Silber等, 上掲; Shestakov等, 上掲)。

【0004】

Hara等、上掲により、 Δ prc突然変異の温度耐性復帰変異体は、遺伝子外抑圧変異体 (spr) を含むことが見出された。彼らは、さらに、野生型spr遺伝子産物が包膜画分中のリポタンパク質であることを同定した。彼らは、野生型spr遺伝子はペプチドグリカン加水分解酵素であることに気づいた (Hara等, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996))。prc-プラスのバックグラウンドにおいてsprが機能しない場合、spr変異のサプレッサーはPBP7、他のペニシリン結合タンパク質であると同定された (Hara等, 1996, 上掲)。また、sprのクローニング及びSprがプロテアーゼによって分解されない Δ prc変異に関してHara等, Abstract for Table Ronde Roussel Uclat no.86, Versailles, May 1997中に記載されており、その中で著者等はprc及びsprは突然変異サプレッサーであると結論づけた。

また、3つのマルチコピーprcサプレッサーも大腸菌のprc(tsp)の完全欠失 (null) 条件致死突然変異を用いて単離されている (Bass等, J. Bacteriol., 178:1154-1161 (1996))。それらの中でspr遺伝子に関連するものは一つも無い。これらのサプレッサーの1セットは、染色体上72.5分にマップされるタンデムに並んだ2つの推定上のプロテアーゼ遺伝子である。これら2つの遺伝子はhtrAホモログであり、各々HtrA(DegP)セリンプロテアーゼと58%及び35%の同一性を持つタンパク質をコードする。同定された他のタイプのサプレッサーは、dksA(dnaKサプレッサー)遺伝子であり、熱ショック遺伝子dank, dnaJ及びgrpEにおける欠損のマルチコピーサプレッサーでもある。また、dksA遺伝子もmukB変異のマルチコピーサプレッサーとして独立に同定され、染色体分配に必要である。3つ目の型は切断されたりポタンパク質A(rlpA)遺伝子である。

【0005】

遺伝子degPは、細胞包膜プロテアーゼDegP(HtrA)の合成をコントロールするようである。degP欠損変異は、Beckwith及びStrauch, 上掲によって初めて構築され、大腸菌内に組換えられた。HtrAは、約500kDaの高分子量を有し、そのタンパク質活性が42℃以上のような高温状態での大腸菌の生存に必須の熱ショックタンパク質である (Skorko-Glonek等, Gene, 163:47-52 (1995))。通常不安定な多くの細胞包膜タンパク質は、degP変異によって安定化される (Strauch及びBeckwith, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1676-1580(1988))。最近、HtrAタンパク質は、6量体のリングの2つのスタックから構成される12量体として挙動することが、電子顕微鏡及び化学的クロスリンク解析によって報告された (Kim等, J. Mol. Biol., 294:1363-1374 (1999))。高温に曝されること若しくはジスルフィド結合の還元などによって、タンパク質基質の構造がほどけることが、二重リング構造のHtrAの内部チャンバーへのアクセスに必須であり、そこでペプチド結合の切断が生じると思われる (Kim等, 上掲)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0006】

多くの異種ポリペプチドが種々のプロテアーゼ欠損株中で産生されている。しかしながら、その多くの株は、相対的に低い産生力価及び／又は低い増殖を示した。産物の切断が起こらず、高い産生力価を提供するプロテアーゼ欠損細菌株を供給する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

従って、本発明は特許請求の範囲に記載された通りである。一態様において、本発明はプロテアーゼDegP及びPrcを各々コードする染色体上のdegP及びprc中に欠損を持ち、その遺伝子産物がprc変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する変異spr遺伝子を有するか又は含む大腸菌株を提供する。好ましくは、その株は、プロテアーゼIIIをコードする染色体上のptr3及び／又はプロテアーゼOmpTをコードする染色体上のompTに欠損を持たない。好ましくは、その大腸菌株は、高い細胞密度の発酵過程の定常増殖状態における生存のために、変異spr遺伝子をdegPΔ prcΔ 株に導入することにより設計することができる。

他の実施態様において、その株にとって異種性のポリペプチド、好ましくはタンパク質分解に感受性なポリペプチド、より好ましくは真核生物のポリペプチドをコードする核酸を含む。

他の実施態様において、本発明は異種のポリペプチド、すなわちその株にとって異種なものを生産するための方法を提供する。この方法は、プロテアーゼPrcをコードする染色体上のprcに欠損を持ち、その遺伝子産物がprc変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する変異spr遺伝子を有するか又は含む大腸菌株を初めに培養することを含む。また、この株は異種性のポリペプチドをコードする核酸も含む。培養の結果核酸が発現される。本方法の第二のステップは、いずれにしてもサイトプラズム、ペリプラズム又は培地から、好ましくはペリプラズム又は培地、最も好ましくは発酵槽の全培養液から、該ポリペプチドがその株から回収される。好ましくは、該ポリペプチドはApo2リガンド又は抗体であり、抗体の断片を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

好ましい実施態様の詳細な説明

定義

ここで用いられる場合、一般に、「ポリペプチド」は約10アミノ酸より多くを有するペプチド及びタンパク質のことを意味する。「異種の」ポリペプチドは、大腸菌によって産生されるヒトタンパク質のような、利用される宿主細胞にとって外来のポリペプチドである。ポリペプチドは原核生物又は真核生物のものであるが、好ましくは、それは真核生物のものであり、より好ましくは哺乳類のものである。

【0009】

哺乳類ポリペプチドの例は、例えば、レニン、ヒト成長ホルモンを含む成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク；1-アンチトリプシン；インスリンA-鎖；インスリンB-鎖；プロインスリン；トロンボポエチン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子V I I I C、因子I X、組織因子、及びフォン・ヴィレブランド因子等の凝固因子；プロテインC等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性剤；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化剤（t-PA）等のプラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子-α及びベータ；ErbB2の細胞外ドメイン領域と結合する（例えば、ErbB2の約残基22から約残基584を含む領域中の任意の一又は複数の残基）、2C4（WO 01/00245；ハイブリドーマATCC HB-12697）などのErbB2ドメインに対する抗体、エンケファリナーゼ；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミューラー阻害物質；リラキシンA-鎖；リラキシンB-鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；ベーターラクタマーゼ等の微生物タ

ンパク質；DNase；インヒビリン；アクチビン；血管内皮成長因子（VEGF）；ホルモン又は成長因子のレセプター；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6（NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6）などの栄養因子、又はNGF等の神経成長因子；カルジオトロフィン-1（CT-1）等のカルジオトロフィン（心臓肥大因子）；血小板誘導成長因子（PDGF）；aFGF及びbFGF等の線維芽細胞成長因子；上皮成長因子（EGF）；TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5を含むTGF- α 及びTGF- β などのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-I及び-II（IGF-I及びIGF-II）；des(1-3)-IGF-I（脳IGF-I）、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質（BMP）；インターフェロン-アルファ、-ベータ、及び-ガンマ等のインターフェロン；ヒト血清アルブミン（HSA）又はウシ血清アルブミン（BSA）などの血清アルブミン；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン（ILs）、例えば、IL-1からIL-10；抗-HER-2抗体；Apo-2リガンド；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性抗原、例えばAIDSエンベロープの一部等；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；抗体；及び上に列挙した任意のポリペプチドの断片などの分子を含む。

【0010】

対象の好ましいポリペプチドは、HSA、BSA、抗-IgE、抗-CD20、抗-IgG、t-PA、gp120、抗-CD11a、抗-CD18、2C4、抗-VEGF、VEGF、TGF- β 、アクチビン、インヒビリン、抗-HER-2、DNase、IGF-I、IGF-II、脳IGF-I、成長ホルモン、リラキシン鎖、成長ホルモン放出因子、インスリン鎖又はプロインスリン、NGF、NT-3、BDNF、Apo2リガンド、及びウロキナーゼなどのポリペプチドを含む。特に好ましい哺乳類のポリペプチドは抗体であり、完全長抗体、抗体断片、及びApo2リガンドを含む。さらに好ましくは、これらの抗体はヒト又はヒト化抗体である。これらは、例えば、抗-IgE、抗-IgG、抗-Her2、抗-CD11a、抗-CD18、抗-CD20、及び抗-VEGF、2C4、BSA、又はHSAを含む。さらにより好ましくは、該抗体は、抗-CD18、抗-VEGF、抗-組織因子、2C4、抗-Her2、抗-CD20、抗-CD40、又は抗-CD11a抗体である。ポリペプチドの定義に含まれる抗体断片は、例えば、Fab、Fab'、Fab'2又はFab'2-ロイシンジッパー(LZ)を含み、最も好ましくは抗-CD18 Fab'2-LZ、抗-組織因子 Fab'2 LZ-6xhis、抗-VEGF Fab、抗-CD8 hisタグ化Fab'2 LZ及び抗-CD18 lysタグ化Fab'2 LZである。

【0011】

ここで用いられる場合、ポリペプチドに対して「タンパク質分解に感受性な」なる記述子は、ネイティブな状態又は分泌過程のいずれかにおいて、一又は複数の大腸菌のプロテアーゼにより切断され易く、切断を受けやすく、又は切断されるポリペプチドのことを意味する。

「高い細胞密度」での発酵又は培養とは、典型的には最初に幾つかの栄養分がバッチ中に添加され、細胞増殖を可能にし、測定が容易な、酸素消費と溶解酸素を利用するグルコース消費との間の関係をうまく利用し、グルコース添加をコントロールする過程のことを意味する。より高い細胞密度を達成するために、アンモニアを連続的に添加してもよく、以下の実施例中でさらに詳細に説明されるように、更なるマイナーな栄養分（例えば、P、K、S及びMg）が発酵のある段階で添加されてもよい。

「その遺伝子産物がprc変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する遺伝子である、変異体spr遺伝子」とは、Hara等、1996、上掲によって報告された配列を持つ大腸菌のprcサプレッサー（spr）（Prc^{s^{up}}をコードする）、又は変異が導入され、該遺伝子産物がprc変異株の成長表現型のサプレッサーとして機能するものを意味する。好ましくは、該変異は一の点突然変異から成る。最も好ましくは、TGGコドンがCGGに置換され、その結果アミノ酸148のトリプトファンからアルギニンへの変化が生じる点突然変異W148Rである。

10

20

30

40

50

ここでの「抗体」なる用語は、所望の生物学的活性を示す限りにおいて、最も広い意味で用いられ、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷な抗体、及び抗体断片から形成される多特異的抗体（例えば、二価抗体）をカバーする。

【0012】

ここで用いられる「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体（群）の集団、即ちその集団が、少量存在し自然発生的に生じ得る変異を除いて同一である集団を含む個別の抗体（群）を意味する。モノクローナル抗体は非常に特異性が高く、単一の抗原性部位に対して作製される。さらに、異なる決定基（エпитープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体標品とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して作製される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は他の抗体によって汚染されずに合成される点において有利である。「モノクローナル」という形容詞は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Koehler等、Nature, 256:495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製することができ、又は組換えDNA法によって調製することができる（例えば、米国特許第4,816,567号）。また、「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等、Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)中に記載の技術を用いたファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

ここでのモノクローナル抗体は、重及び／又は軽鎖の一部が特定の種に由来するか又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応配列と同一であるか又は相同であって、鎖の残部が他の種に由来するか又は他の抗体クラス又はサブクラス、並びに所望の生物学的活性示す範囲内においてそのような抗体の断片に属する対応配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体を特に含む（米国特許第4,816,567号；及びMorrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。ここにおける対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界モンキー、サルなど）由来の可変ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

【0013】

「抗体断片」は無傷の抗体の一部を含み、好ましくは抗原結合又はその可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab, Fab', F(ab')₂, 及びFv断片；ダイアボディー；直鎖抗体；単一鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異的抗体が含まれる。

「無傷」の抗体は、抗原結合可変領域並びに軽鎖定常ドメイン（C_L）及び重鎖定常ドメイン、C_{H1}、C_{H2}及びC_{H3}を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を持つ。

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（アミノ酸配列の変異を持つ天然配列Fc領域又はFc領域）に起因するこれらの生物学的活性のことを意味する。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合、補体依存性細胞障害、Fcレセプター結合、抗体依存性細胞障害（ADCC）、食作用、細胞表面レセプターの下流制御（例えば、B細胞レセプター；BCR）などが含まれる。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、無傷の抗体は異なる「クラス」に分類することができる。無傷な抗体について5つの主要なクラスが存在する：IgA, IgD, IgE, IgG, 及びIgM, 及びこれらの幾つかはさらに「サブクラス」（アイソタイプ）に分類され、例えば、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 及びIgA2である。抗体の異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、各々、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ である。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構造は周知である。

【0014】

「抗体依存性細胞媒介障害」及び「ADCC」は、Fcレセプター（FcRs）を発現する非特異的細胞障害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が標的細胞上に結合した抗体を認識し、次に標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応のことを意味する。ADCCを媒介する主要な細胞、NK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対

し、単球はFcRI, FcRII, FcRIIIを発現する。造血性細胞におけるFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-492 (1991)のp464に掲載の表3にまとめられている。対象の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号又は米国特許第5,821,337号中に記載されているインビトロADCCアッセイが実施されてもよい。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は付加的に、対象の分子のADCC活性を、インビボ、例えばClynesら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:652-656 (1998)中に開示されているような動物モデル中で評価してもよい。

「ヒトエフェクター細胞」は、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。好ましくは、該細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単球細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞、及び好中球で、好ましくはPBMCs及びNK細胞である。エフェクター細胞は、その天然のソース、例えば、ここで記載された血液又はPBMCsから単離されてもよい。

【0015】

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖とからなる、約150,000ダルトンの異種四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合されているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。また各重及び軽鎖も規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は一端に可変ドメイン(V_H)を有し、それに多数の定常ドメインが続く。各軽鎖は一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

「可変」なる用語は、可変ドメインのある部分が抗体間で配列が広範囲に相違し、各特定の抗体のその特定抗原への結合及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかし、可変性は抗体の可変ドメイン全体に均一に分布しているのではない。それは、軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方における高度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、βシート構造を連結し、その一部を形成することもあるループを形成する、3つの高度可変領域により連結された、主としてβシート構造を採る4つのFR領域を含む。各鎖の高度可変領域はFR領域により近接して保持され、他の鎖からの高度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係しないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)への抗体の寄与を示す。

【0016】

ここで使用される「超可変領域」なる用語は、抗原との結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及び/又は「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

「フレームワーク領域」又は「FR」残基はここに定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

抗体のパパイン消化により、各々が単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、その名称が容易に結晶化する能力を表す、残りの「Fc

10

20

30

40

50

」断片が産生される。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、更に抗原を架橋させ得る $F(a b')_2$ 断片が生じる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この構造では、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互に作用して $V_H - V_L$ 二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの超可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0017】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。ここでは、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つのフリーのチオール基を担持しているFab'に対する命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学カップリング法も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、ここで、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはscFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にする。scFvの総説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。抗ErbB2抗体scFv断片はW0 93/16185; 米国特許第5,571,894号; 及び米国特許第5,587,458号中に記載されている。

「ダイアボディ(diabodies)」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖($V_H - V_L$)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同鎖上の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097; W0 93/11161; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)においてより詳細に記載されている。

【0018】

非ヒト(例えば、げっ歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分においてヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、全てあるいは実質的に全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収され

10

20

30

40

50

たものである。その自然環境の夾雑成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1) ローリー法で測定して抗体の95重量%を越え、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2) スピニングカップシークエネーターを使ったN末端又は内在するアミノ酸配列の少なくとも15残基を取り出すのに十分な程度まで、又は(3) クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元状態の下でのSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。単離された抗体は、抗体の自然な環境の少なくとも一成分は存在しないことから、組換え細胞中にインサイツで存在する抗体を含む。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

10

【0019】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に配置されているときに「作用可能に結合され」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合しており；プロモーターは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合しており；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にあるならば、コード配列と作用可能に結合されている。一般的に、「作用可能に結合される」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて翻訳枠にあることを意味する。結合は都合のよい制限酵素部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、通常の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

20

ここで用いられるように、「細胞」、「株化細胞」及び「細胞培養」は相互に交換可能な意味で用いられ、その全ての用語は子孫を含むものと理解される。従って、「形質転換体」あるいは「形質転換細胞」という用語は、初代の対象細胞及び何度培養が継代されたかに関わらず最初のものから誘導された培養を含む。また、全ての子孫が、意図的な変異あるいは意図しない変異の影響で、正確に同一のDNAを有するわけではないことも理解すべきである。本来の形質転換細胞についてスクリーニングしたものと同一機能又は生物活性を有する変異体子孫が含まれる。命名を区別することが意図されている場合は、文脈から明らかであろう。

30

【0020】

発明の実施の形態

本発明は、染色体上で各々DegP及びPrcをコードするdegP及びprcに欠損を持ち、変異spr遺伝子を有し、その遺伝子産物がprc変異を有する株によって示される成長表現型を抑制する、大腸菌株を提供する。場合によっては、この株はさらに染色体上でプロテアーゼII Iをコードするptr3及び／又は染色体上でOmpTをコードするompTに欠損を持つ。

他の実施態様において、該株は、該株にとって異種性のポリペプチドをコードする核酸を含む。該株は、好ましくは、組換え発現ベクターの使用などにより、好ましいDNA(cDNA又はゲノムDNA)である核酸で形質転換される。

40

さらなる側面において、本発明はそのような異種性のポリペプチドを産生するための方法を提供する。この方法において、ポリペプチドをコードする核酸も含む上記大腸菌株は、核酸が発現されるように培養される。次に、そのポリペプチドは該株から回収される。回収は該株のペリプラズム又は培地からでもよい。好ましくは、培養は発酵槽で行われ、より好ましくは高い細胞密度での発酵条件下にある。

培養変数が用いられ、ポリペプチドの産生は下記の方法のような通常の方法で行われる。

【0021】

A. 核酸の選択及びその修飾

核酸が対象のポリペプチドをコードするならば、対象のポリペプチドをコードする核酸は

50

、任意のソースに由来するRNA、cDNA、又はゲノムDNAが適当である。大腸菌中で、異種性のポリペプチド（その変異体を含む）の発現に適切な核酸の選択方法は周知である。

モノクローナル抗体を産生する場合、モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましいソースとして役に立つ。一度単離されると、DNAは発現ベクター中に配置され、次いで、組換え体宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を行うためにここで示す細菌宿主細胞へ形質転換させる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え体発現に関する総説には、Skerraら、*Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)及びPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)が含まれる。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、超可変領域配列をヒト化抗体の対応配列と置換することによりWinter及び共同研究者（Jonesら、*Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmannら、*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoevenら、*Science*, 239:1534-1536 (1988)）の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には超可変領域残基及びおそらく幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0022】

抗原性の軽減のためには、ヒト化抗体を作成するために使用するヒトの可変ドメイン、軽鎖及び重鎖両方の選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」に従うと、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯動物のものと最も近いヒトの配列を次にヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（FR）として受け入れる（Sims等、*J. Immunol.*, 151:2296 (1993)；Chothia等、*J. Mol. Biol.*, 196:901(1987)）。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる（Carter等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992)；Presta等、*J. Immunol.*, 151:2623 (1993)）。

さらに、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、超可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0023】

ヒト化抗体又は親和性成熟抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体又は親和性成熟抗体は、免疫結合体を調製するために一又は複数の標的薬剤（類）と随意に結合している抗体断片、例えばFabであってよい。あるいは、ヒト化抗体又は親和性成熟抗体は無傷抗体、例えば無傷IgG1抗体であってよい。

Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収され、F(ab')₂断片（Carter等、*Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)）を形成するために化学的にカップルされる。他のアプローチによると、F(ab')₂断片は組換え体宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体断片の産生の

ための他の技術は、熟達した技術者にとっては明白である。他の実施態様において、選択された抗体は、単鎖Fv断片(scFv) (W093/16185; 米国特許第5,571,894号及び5,587,458号)である。また、抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号中に記載されているような「直鎖抗体」であってもよい。このような直鎖抗体断片は単一特異的又は二重特異的であってもよい。

二重特異的抗体は少なくとも2つの異なるエピトープに対して特異的に結合する抗体である。例示的な二重特異的抗体は、Dkk-1タンパク質の2つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異的抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異的抗体)として調製することができる。

異なるアプローチによると、望ましい結合特異性を有する抗体の可変ドメインは(抗体-抗原結合部位)免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合される。融合は、好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。軽鎖との結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を有し、少なくとも融合の片方に存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合、必要ならば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、安定細菌性宿主生物体に同時形質転換する。このことは、構築物中で用いられる3つのポリペプチド鎖の等しくない割合が至適な収量を提供する場合、実施態様中、3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整する点に多大なる柔軟性を提供する。しかし、等しい割合の少なくとも2つのポリペプチドの発現により高い収量を生み出すか、その割合が特に有意でない場合、ある発現ベクターにおいて2又は全3つのポリペプチド鎖に対するコード配列を挿入する事は可能である。

【0024】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

米国特許第5,731,168号に記載された他のアプローチ法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常領域のC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4,676,980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近

接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された Fab' 断片はついでチオニトロベンゾアート (TNB) 誘導体に転換される。Fab'-TNB 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により Fab'-チオールに再転換し、他の Fab'-TNB 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作製された二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0025】

さらに、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収され、二重特異的抗体を形成するために化学的にカップリングされ得る (Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992))。

組換え体の細胞培養物から直接二重特異的抗体断片を調製し、単離するための種々の方法も、記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して産生されている (Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992))。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のFab'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの産生に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V_L) に重鎖可変ドメイン (V_H) を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、これにより2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 Fv (s Fv) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている (Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994))。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる (Tuttら J. Immunol. 147:60 (1991))。

ポリペプチド変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、これらに限られないが、天然源からの単離 (天然発生アミノ酸配列変異体の場合) 又はオリゴヌクレオチド媒介 (又は部位特異的) 突然変異誘発、PCR突然変異誘発、又は該ポリペプチドの初期調製された変異体又は非変異体種のカセット突然変異誘発を含む。

【0026】

エフェクター機能に関する本発明の抗体を修飾することは、例えばFcレセプター結合性を増強するために、望ましい。このことは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸置換を導入することで達成される。あるいは、又は付加的にシステイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されたようにして、抗体 (特に抗体断片) にサルベージレセプター結合エпитープが導入される。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エпитープ」なる用語は、IgG分子のインヴィボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子 (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃ 又は IgG₄) のFc領域のエピトープを意味する。

ここでは、抗体の他の修飾が考慮される。例えば、抗体は種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーに結合してもよい。

【0027】

B. 複製可能なベクターへの核酸の挿入

異種の核酸 (例えば、cDNA又はゲノムDNA) は、適切なプロモーターのコントロールの下、細菌中における発現のための複製可能なベクターへ適切に挿入される。多くのベクターは、かかる目的のために利用可能であり、適当なベクターの選択は、主として挿入されるべき核酸のサイズ、及びベクターにより形質転換される特定の宿主細胞に依存する。各ベクターは、それが適合する特定の宿主細胞に依存する種々の成分を含む。特定の宿主タイ

ブに依存し、一般にベクター成分には、限定はしないが、以下の一又は複数が含まれる：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、プロモーター、及び転写終結配列。

一般には、宿主細胞と適合性のある種に由来するレプリコン及びコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、大腸菌宿主との関連で用いられる。そのベクターは、通常、複製部位、並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を保持する。例えば、大腸菌は、典型的には、*E. coli*種由来のプラスミドであるpBR322を使って形質転換される（例えば、Bolivar等、Gene, 2: 95 (1977)参照）。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、よって形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。そのpBR322プラスミド、もしくは他の微生物プラスミド又はファージもまた、選択マーカー遺伝子の発現のために大腸菌宿主によって使用され得るプロモーターを含むか、又は含むよう改変される。

【0028】

(i) シグナル配列成分

ここで対象となるポリペプチドをコードするDNAは、直接発現されるだけでなく、好ましくはシグナル配列あるいは成熟ポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合体としても産生される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、又はベクターに挿入されたポリペプチドDNAの一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され加工される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。

天然又は真核生物のポリペプチドシグナル配列を認識しない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p pあるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。

【0029】

(ii) 複製開始点成分

発現ベクターは、一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は様々な細菌に対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大腸菌などの大部分のグラム陰性細菌に好適である。

(iii) 選択遺伝子成分

通常、発現ベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。この遺伝子は、選択培地中で増殖する形質転換された宿主細胞の生存又は増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されない宿主細胞は、培地中で生存できない。この選択可能マーカーは、この発明で利用され、定義されるような遺伝学的マーカーとは区別される。典型的な選択遺伝子は、(a)例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトロキサセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質又はその他の毒素に耐性を付与し、(b)遺伝学的マーカーの存在によって誘導される欠陥以外の栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバチラス菌に対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

選択技術の一例においては、宿主細胞の増殖を抑止する薬物が用いられる。この場合、対象の核酸で首尾よく形質転換したこれらの細胞は、抗薬物性を付与し、選択療法を生存するポリペプチドを産生する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン（Southern等、J. Molec. Appl. Genet, 1:327 (1982)）、ミコフェノール酸（Mulligan等、Science, 209:1422 (1980)）又はハイグロマイシン（Sugden等、Mol. Cell. Biol., 5:410-413 (1985)）が使用される。上述の3つの例は、各々、適当な薬剤であるG418又はネオマイシン（ジェネティシン）、xgpt（ミコフェノール酸）、又はハイグロマイシンに対する耐性を伝達するために、真核生物でのコントロールの下、細菌性遺伝子を利用する。

【0030】

(iv) プロモーター成分

対象のポリペプチドを産生するための発現ベクターは、宿主生物によって認識され、対象

のポリペプチドをコードする核酸と作用可能に連結される適切なプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 (Chang等, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel等, *Nature*, 281:544 (1979))、アラビノースプロモータシステム (Guzman等, *J. Bacteriol.*, 174:7716-7728 (1992))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776)、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター (deBoer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983))を含む。しかし、他の既知の細菌性プロモーターも適当である。それらのヌクレオチド配列は公表されており、それにより、任意の必要な制限酵素サイトを供給するためのリンカー又はアダプターを用いて、当業者は対象のポリペプチドをコードするDNAにそれらを作用可能に連結する (Siebenlist等, *Cell*, 20:269 (1980)) ことが可能となる。

10

また、細菌のシステムで使用されるプロモーターも、通常、対象のポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガルノ(S.D.)配列を有する。該プロモーターは、制限酵素による切断により細菌性のもとになるDNAから取り外すことができ、所望のDNAを含むベクター中へ挿入することができる。

【0031】

(v) ベクターの構築及び解析

一又は複数の上に列挙した成分を含む適切なベクターの作成には標準的なライゲーション技術を用いる。単離されたプラスミド又はDNA断片を切断させ、整え、そして必要とされるプラスミドの生成のために望ましい型に再ライゲーションする。

20

構築されたプラスミド中において正しい配列であることを確認する解析のために、ライゲーション混合物を用いて、大腸菌K12菌株294 (ATCC 31446)又は他の株を形質転換し、適当な場合にはアンピシリン又はテトラサイクリン耐性によって、成功した形質転換細胞を選択する。形質転換細胞からプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化により解析し、及び／又はSanger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467 (1977)又はMessing等, *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981)の方法により、又はMaxam等, *Methods in Enzymology*, 65:499 (1980)の方法により配列決定を行った。

C. 宿主細胞の選択及び形質転換

ここでの発現プラスミドに親宿主として適する大腸菌宿主は、大腸菌W3110 (ATCC 27,325)、大腸菌294 (ATCC 31,446)、大腸菌B及び大腸菌X1776 (ATCC 31,537)を含む。これらの例は、限定的なものではなく例示的なものである。また、上記に述べた株のいずれかの変異細胞もここで必要とされる少なくとも最少の遺伝型を含むように変異を導入する出発宿主として利用してもよい。組換えDNA産物の発酵のための通常の宿主である点から、大腸菌株W3110は、親宿主として望ましい。親宿主として使用される出発大腸菌宿主の例が、それらの遺伝子型とともに、下記の表に示されている：

30

【0032】

株	遺伝子型
W3110	K-12 F ⁺ lambda ⁻ IN(rrnD-rrnE)1
1A2	W3110 Δ shuA
9E4	W3110 Δ shuA ptr3
27A7	W3110 Δ shuA ptr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169
27C6	W3110 Δ shuA ptr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT
27C7	W3110 Δ shuA ptr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R)
33D3	W3110 Δ shuA ptr3 lacIq lacI8 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R)
36F8	W3110 Δ shuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 ptr3 degP41 (Δ pstI-kan ^R) ilvG2096 ^R
43D3	W3110 Δ shuA ptr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R) ilvG2096 ^R
43E7	W3110 Δ shuA Δ (argF-lac)169 Δ ompT ptr3 phoA Δ E15 degP41 (Δ pstI-kan ^R) ilvG2096 ^R
44D6	W3110 Δ shuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^R) Δ ompT ilvG2096 ^R
45F8	W3110 Δ shuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^R) Δ ompT phoS* (T10Y) ilvG2096 ^R
45F9	W3110 Δ shuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^R) Δ ompT ilvG2096 ^R phoS* (T10Y) Δ cyo::kan ^R

【0033】

また、36F8を作製する際の間体、即ち、27B4（米国特許第5,304,472号）及び35E7（27B4より増殖の優れた自発的溫度耐性単離コロニー）も適当である。さらに適当な株は、米国特許第4,946,783号、1990年8月7日発行中に開示されている変異体ペリプラズムプロテアーゼを有する大腸菌株である。

本発明の株は、親株の染色体組込み、又は下記の実施例に示すものを含む他の技術によって作製されてもよい。

ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞へ挿入する。好ましくは、宿主細胞を上述の発現ベクターで形質転換し、種々のプロモーターを誘導するのに適するように変更された通常の栄養培地中で培養することにより達成される。

形質転換とは、染色体外成分又は染色体に挿入されたものとしてDNAが複製可能なように該DNAを生物体中へ導入することを意味する。使用される宿主細胞に依存して、形質転換はそれらの細胞に適する標準的な技術を用いて行われる。Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)のセクション1.82に記載されるように、塩化カルシウムを利用するカルシウム処理は、一般的に原核細胞又は実質的に細胞壁障壁を含む他の細胞へ用いられる。形質転換のための他の方法には、Chung及びMiller, Nucleic Acids Res., 16:3580 (1988)中で記載されるように、ポリエチレングリコール/DMSOが用いられる。さらに他の方法は、エレクトロポレーションと称される技術の使用である。

【0034】

D. 宿主細胞の培養

対象のポリペプチドを生産するために使用される原核細胞は、Sambrook等、上掲中に一般的に記載されるように適当な培地中で培養される。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択される宿主についてすでに使用された条件であり、当業者にとって明らかである。

アルカリホスフェートプロモーターが使用される場合、本発明の対象のポリペプチドの生

産のために使用される大腸菌細胞は、Sambrook等、上掲中に一般的に記載されるようにアルカリホスフェートプロモーターが部分的に又は完全に誘導され得る適切な培地中で培養される。必要とされる培養は、無機リン酸塩の非存在下又はリン酸塩欠乏レベル下では、決して起こらない。第一に、培地は無機リン酸塩をタンパク質合成の誘導レベル以上であり、細菌の増殖に十分な量の無機リン酸塩を含む。細胞が増殖し、リン酸塩を利用する場合、培地中のリン酸塩レベルを低下させ、それによりポリペプチドの合成の誘導を引き起こす。

炭素、窒素及び無機リン酸塩ソース以外の任意で他に必要な培地成分には、単独又は他の成分との混合物又は複合窒素源のような培地から誘導される適切な濃度も含まれる。培地のpHは約5-9のいずれかのpHであって、主として宿主生物に依存する。

プロモーターが、起こるべき誘導に関し誘導可能なプロモーターである場合、典型的に細胞はある至適な濃度、例えば、高い細胞濃度過程を用い、点誘導が開始される（例えば、誘導因子の添加、培地成分の除去により）約200のA₅₅₀が達成されるまで培養され、対象のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を誘導する。

【0035】

E. 発現検出

遺伝子の発現は、ここでポリペプチドの配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。種々の標識が使用され、最も一般的なものは、放射性同位体、特に³²Pである。しかしながら、ポリヌクレオチドへの導入のためにビオチン修飾ヌクレオチドを用いるなど、他の技術も使用してよい。次いで、ビオチンはアビジンまたは抗体と結合するための部位として機能し、広範な種々の標識、例えば放射性核種、蛍光、酵素などで標識されてよい。あるいは、タンパク質の検出のためにアッセイ又はゲルが用いられてもよい。

発現された遺伝子産物の分泌に関して、宿主細胞は遺伝子産物の分泌に十分な条件下で培養される。そのような条件には、例えば、細胞による分泌を可能にする温度、栄養素及び細胞密度条件が含まれる。さらに、そのような条件は、細胞が、当業者にとって既知の、転写、翻訳、及び一の細胞内区画から他の区画へのタンパク質の通過に関する基本的な細胞機能を行うことができる条件下である。

【0036】

F. ポリペプチドの精製

以下の方法は、単独又は組合わせた形態で、ポリペプチドのタイプに依存して使用される特定の方法による、適切な精製方法の例示である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；疎水性相互作用クロマトグラフィー；シリカによるクロマトグラフィー；S-SEPHAROSETM及びDEAEなどのイオン交換レジンによるクロマトグラフィー；等電点電気泳動；SDS-PAGE；硫酸沈殿；及び、例えば、SEPHADEXTM G-75を用いたゲルろ過。

モノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の抗体精製方法などにより、培地から適切に分離される。

本発明は、以下の実施例を参照することにより、さらに十分に理解されるであろう。しかし、それらは、本発明の範囲を限定して解釈されるべきものではない。すべての文献及び特許の引例は出典によりここに取り込む。

【0037】

実施例 1

材料及び方法

A. 発現プラスミド

1. rhuFab' 2LZ(xCD18)及びタグ化誘導体を発現するためのプラスミド pS1130

10

20

30

40

50

プラスミド pS1130は、米国特許第6,180,367号及び6,258,560号に記載されるpBR322に基づくプラスミドである。rhuFab' 2LZ(xCD18)の合成は、大腸菌アルカリホスファターゼ (AP) プロモーターによって制御される。APプロモーターが、リン酸塩の除去により誘導される場合、STIIシグナルκ軽鎖コード化配列；STIIシグナル重鎖コード化配列の順でジストロニックメッセンジャーRNAを形成し、次いでロイシンジッパー配列を形成する。λ転写終結因子は、翻訳終止コドンの近傍に配置される。

pcyc34

プラスミド pcyc34は、tacIIプロモーターを有するpS1130の対応物である。

pxCD18-7T3

2つの分離した翻訳ユニット、pxCD18-7T3を包含するデュアルプロモータープラスミドは、重鎖の転写から軽鎖の転写の一時的な分離を可能ならしめる。pS1130の場合、軽鎖はphoAプロモーターのコントロール下にとどまる。しかし、pxCD18-7T3中では、λ t₀転写終結因子が軽鎖コード化配列の後に配置される。この終結因子の下流に、tacIIプロモーターが重鎖断片/C末端ロイシンジッパーの転写をコントロールするために付加された (DeBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983))。第二のλ t₀転写終結因子はこのコード化配列の後に配置される。STIIシグナル配列のサイレントコドン変異は、両鎖の分泌を導くために使用された (Simmons及びYansura, Nature Biotechnology, 14:629-634 (1996))。特に、STIIシグナル配列中のヌクレオチドが、軽鎖が相対強度7のTIRを有し、重鎖が相対強度3のTIRを有するように変更され、軽鎖及び重鎖の両方に先行するシグナル配列の最後の3つのヌクレオチドは、GCTである。この2つのプロモーターシステムにおいて、phoAプロモーター配列と軽及び重抗体鎖に関するDNAはpS1130中のものと同一である。

【0038】

pAB3

プラスミド pAB3は、抗CD18F(ab')₂を大腸菌のペリプラズム中でアルカリホスファターゼプロモーターのコントロール下で発現させるようにデザインされており (Kikuchi等, Nucleic Acids Res., 9 (21):5671-5678 (1981))、ロイシンジッパーを有し、Hisタグ化されている。熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列 (Picken等, Infect. Immun., 42:269-275 (1983)) が、軽及び重鎖に先行し、重鎖のC末端上にて酵母GCN4ロイシンジッパーと融合し、その後に6のヒスチジン残基が配置される。軽及び重鎖コード化配列は、重鎖遺伝子の後にλ₀転写終結因子 (Scholtissek及びGrosse, Nucleic Acids Res., 15:3185 (1987)) を有するポリシストロニック構造中に存在する。

プラスミド pAB3は、3つのDNA断片を共にライゲートすることにより構築されたが、その最初の断片は、KpnI-SphI小断片が除去されたベクターpS1130であった。ライゲーション産物中の第2の部分は、pS1130由来のおよそ645塩基対のKpnI-HindIII断片であった。ライゲーション産物中最後の部分は、以下の配列を持つ合成DNA二重鎖であった：

5' -AGCTTGTCGGGGAGCGCCATCACCATCACCATCACTAAGCATG (配列番号:6)

ACAGCCCCCTCGCGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTC-5' (配列番号:7)

pAB21

プラスミド pAB21は、重鎖のC末端に存在する6のヒスチジン残基が6のリジン残基によって置換されているpAB21の誘導體である。プラスミドは、ライゲーション産物中に使用される合成DNAが以下のものである点を除いて、pAB3と同じ方法で構築された：

5' -AGCTTGTCGGGGAGCGCAAAAAGAAAAAGAAAAAGTAAGCATG (配列番号:8)

ACAGCCCCCTCGCGTTTTTCTTTTCTTTTTCATTC-5' 配列番号:9)

【0039】

2. 抗TF Fab' 2LZ-6xhisを発現するためのプラスミド

抗組織因子Fab' 2ロイシンジッパー-6xhisの生産を導くように構築された、プラスミドD3H44-F(ab')₂ (pD3h44f2としても知られている) は、HC及びLCの可変領域がxCD18 VL/VHからxTF VL/VHへ変更された点を除いて、pAB3と厳密に同一のバックボーンDNAを有する。このプラスミドは、国際公開第01/70984号、2001年9月27日公開中に記載されている。

特に、まず、抗TF Fab(D3H44-F(ab))を発現するプラスミドは、以下のように調製された：変異導入と大腸菌中でのF(ab)sの発現に使用されたpEMX1は、Werther等, J. Immunol., 157:4986-4995 (1996)中に記載されている。簡単には、該プラスミドは、ヒト κ サブグループIコンセンサス軽鎖(VL κ I-CL)、ヒトサブグループIIIコンセンサス軽鎖(VHIII-CH1)をコードするDNA断片、及びアルカリホスファターゼプロモーターを含む。VL及びVHのコンセンサス配列の使用は、Carter等, Bio/Technology, 10:163-167 (1992); Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)中に記載されている。

部位指向性突然変異誘発(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492 (1985))は、pEMX1のデオキシウリジン含有テンプレート上で実施された。6のCDRsは、マウスD3配列と置換された；各CDR中に含まれる残基は、Kabatr等, 上掲とChothia等, Nature, 342: 877-833 (1989)のCDR-H1の定義を組合わせて定義されたCDR-H1、即ち、CDR-H1が重鎖中のH26-H35残基から伸長するように定義された点を除いて、配列ベースのCDR定義(Kabat等, Sequence of proteins of immunological interest, Ed. 5, Public Health Service(National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))によるものであった。従って、D3H44-F(ab)は、6の完全なマウスCDR配列を持つ完全ヒトフレームワーク(VL κ サブグループI及びVHサブグループIII)から構成されるF(ab)をコードした。

D3H44-F(ab')₂は、重鎖のヒンジ(CPPCPAPELLGG; 配列番号: 10)のD3H44-F(ab)のC末端への付加によって作製され、その後GCN4ロイシンジッパー及び精製用の(his)₆タグ(ロイシンジッパー及びhis₆タグに関する上述のpAB3の記述を参照のこと)が配置された。

【0040】

3. 抗VEGF Fabを発現するプラスミド

pY0317

親和性成熟抗VEGF Fabタンパク質Y0317は、Chen等, J. Mol. Biol., 293:865-881 (1999)中に記載されている。それを産生するプラスミド、pY0317を構築するために、簡単には、発現カセットが大腸菌プラスミドpBR322のフレームワーク中のEcoRIサイトにクローン化された(Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43:77-90 (1978))。発現カセットは少なくとも以下の基本的なコンポーネントを含んでいた：(1)転写のコントロールのためのphoAプロモーター；(2) λ t₀転写終結因子；及び(3)翻訳を促進する大腸菌trp又は熱安定性エンテロトキシンII(STII)遺伝子、又は両者の組合わせに由来するシャインーダルガルノ配列。細菌性発現カセットの基本的構成成分は、当該技術分野において既知であり、例えば、Kikuchi等, Nucleic Acids Res., 9(21):5671-5678(1981) (phoAプロモーターに関し)；Scholtissek及びGrosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987) (λ t₀終結因子に関し)；Yanofsky等, Nucleic Acids Res., 9: 6647-6668 (1981) (trpに関し)；Picken等, Infect. Immun., 42: 269-275 (1983) (STIIに関し)；及びChang等, Gene, 55: 189-196 (1987) (trpとSTII シャインーダルガルノ配列の組合わせた使用に関し)中に記載されている。さらに、そのSTII配列又はサイレントコドン変異体は、抗VEGF Fabの産生のためのpY0317中で、軽及び重両鎖のコード配列に先行し、ペリプラズム中へのタンパク質の分泌を誘導した。Picken等, Infect. Immun., 42: 269-275 (1983)；Simmons及びYansura, Nature Biotechnology, 14: 629-634 (1996)。1952塩基対発現カセットに対するヌクレオチド及びアミノ酸配列は、組換えタンパク質の生産のためにEcoRIサイトへ挿入され、図1に示してある(各々配列番号: 1及び2)。

【0041】

RhuFab V2 Y0317は、他の抗体に関してすでに記述されている工程(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992)；Presta等, J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993)；Werther等, J. Immunol., 157: 4986-4995 (1996))を使用して、マウスA.4.6.1(Presta等, Cancer Res., 57: 4593-4599 (1997)モノクローナル抗体のヒト化によって作製された。簡単には、muMAb A.4.6.1の可変軽及び可変重鎖をコードするcDNAをマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞からRT-PCRを用いて単離した。これらのcDNAはクローン化し、ヒトCL及びヒトCH1ドメインに融合させ(Werther等, J. Immunol.,

157: 4986-4995 (1996))、マウス-ヒトキメラFabを生産した。6の相補性決定領域(CDRs)(図1中太字で示す)は、コンセンサスヒト κ サブグループI軽鎖及びコンセンサスヒトサブグループIII重鎖をコードするすでにヒト化された抗体ベクター中に移植された(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992))。ヒトフレームワーク中にCDR残基を転移させただけで、VEGF抗原との結合性における1000倍の低下を引き起こした。CDRs近傍の幾つかのフレームワーク残基(図1中イタリック体、下線で示す)も、標的との結合を改善するために変更された(Presta等, Cancer Res., 57: 4593-4599 (1997))。CDR以外では、全部で7の重鎖残基及び1の軽鎖残基が変更された。その後、重及び軽鎖はファージディスプレイベクター(Baca等, J. Biol. Chem., 272: 10678-10684 (1997))に移し、pGHam-g3のhGH遺伝子と置換した(Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990))。メチオニンの酸化を除去するためのVL Met4Leuの変更、及びgeneIII融合のクローニングを容易にするためのVH Thr231Leuの変更を行うために部位指向性突然変異誘発が用いられた。このベクターは、Y0101と称され、VEGFへの結合におけるCDRsの最適化のための出発物として用いた(Muller等, Structure, 6: 1153-1167 (1998))。CDRsH1及びH3中の変異のみが、改善された結合を見出し、最終バージョンのpY0317中へ取り込まれた。pY0101プラスミドからpY0317プラスミドへの変更は: Thr28Asp, Asn31His, His101Tyr, Ser105Thrである。これら全ての変更は、可変重鎖領域中にある。pY0317プラスミドは、Fabファージディスプレイベクターである。このプラスミドのプラスミド模式図が図2Aに示されている。

【0042】

pY0317tet20

プラスミドpY0317tet20は、大腸菌中でrhuFab V-2の生産を誘導するために構築された。図2A及び2Bは、プラスミド構築のフローチャートを示しており、pY0317から出発している。プラスミドpY0317tet20は、十分に性質が明らかにされているpBR322プラスミドの変更バージョンである。639塩基対のAvaI-PvuII断片はプラスミドのpBR322部分から除去された。この除去により、コピー数のコントロールに関与するrop遺伝子が除かれる(Cesareni等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 6313-6317 (1982))。結果的に、プラスミドはpBR322と比較して僅かに上昇したコピー数を持つ。1952塩基対の発現カセット(図1)は、組換えタンパク質の生産のためのEcoRIサイトへ挿入された。プラスミドpY0317tet20は、テトラサイクリンと β ラクタム抗生物質の両方に耐性を示す。該発現カセットは、タンデムに結合した軽鎖及び重鎖の単一コピーを含む。各遺伝子の単一のジシストロニックmRNAへの転写は、大腸菌のphoAプロモーターによって達成される(Chang等, Gene, 44: 121-125 (1986))。各鎖の翻訳開始シグナルは、大腸菌のSTII(熱安定性エンテロトキシン)シャイン-ダルガルノ配列によって提供される。各鎖の翻訳は、細胞質膜を通過してペリプラズム空隙へのペプチドの移行を導く23残基STIIシグナルペプチド(Picken等, Infection and Immunity, 42: 269-275 (1983))から始まる。その後、STIIシグナルペプチドは、大腸菌のリーダーペプチダーゼにより除去される。軽及び重鎖は、ペリプラズムへ分泌された後、天然の構造に折りたたまれ、分子間ジスルフィド結合によって共有結合される。

【0043】

テトラサイクリン耐性は、pY0317の修飾を経た最終のベクター上に配置された(図2A及び図2Bを参照のこと)。pBR322の複製起点、 β -ラクタマーゼ遺伝子、phoAプロモーター、軽鎖全体、及び重鎖(VH)のアミノ末端半分を含むpY0317の3642塩基対のSapI/ApaI断片を、p6G4V11N35A.PEG.の2738塩基対SapI/ApaI断片にレンジーションした。この第2の断片は、重鎖のCH1領域及びpBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む。また、この断片はタンパク質の部位特異的修飾のために重鎖のカルボキシル末端の4つの余分なアミノ酸も含む。4つの余分な残基を含む領域とCH1遺伝子は、BssHII/HpaI消化によって除去され、pY0317のBssHII/XbaI断片と置換されることで、従来の重鎖配列を回復し、部位特異的修飾領域を除去できる。まず、XbaI消化が行われ、突出部分がKlenowとデオキシヌクレオチドで埋められる。その後、BssHII消化後433塩基対断片のゲル精製が行われた

。プラスミドの最終操作は、pBR322のNheIからNdeIまでの断片を、639塩基対のAvaI-PvuII欠失を含むpBR322のNheI/NdeI断片との置換により実施された。最終プラスミドであるpY3017tet20は、テトラサイクリン、 β -ラクタム抗生物質に耐性であり、phoAプロモーターと抗VEGFの軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子を含む。

【0044】

4. Apo2Lを発現するプラスミド

pAPAp2-P2RUは、2001年1月4日に公開されたW001/00832号中に記載されている。簡単には、このプラスミドは、図3にそのコンストラクトが示してあるが、Apo2L（アミノ酸残基114-281）とpro2及びargUによってコードされるtRNAの共発現をコードし、この共発現はアルカリホスファターゼプロモーターによって制御される。pBR322ベースのプラスミド（Su10
tcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43:77-90 (1978))であるpAPAp2-P2RUが、大腸菌でApo-2Lを生産するのに使用された。Apo-2Lの発現に必要な転写及び翻訳配列は、プラスミドphGH1に関して記述されたように（Chang等, Gene, 55:189-196 (1987)）、アルカリホスファターゼプロモーター及びtrpシャイン-ダルガルノにより提供された。Apo-2Lのコード化配列（114から281まで）は、プロモーターとシャイン-ダルガルノ配列の下流に位置し、開始メチオニンによって先行された。コード化配列は、残基Pro119をコードするコドンが潜在的な二次構造を除くために「CCT」の代わりに「CCG」で置換された点を除きApo-2L（図4（配列番号3及び4、各々、ヌクレオチド及びアミノ酸配列に関する））の残基114-281をコードするヌクレオチド（図4に示す）を含む。 λ t₀転写終結因子（Scholtissek等, Nucleic Acids Res., 15:3185 (1987))をコードする配列がApo-20
-2Lコード配列の後にくる。

さらにまた、このプラスミドはtRNAのpro2（Komine等, J. Mol. Biol., 212:579-598 (1990)）とargU/dnaY（Garcia等, Cell, 45:453-459 (1986)）の発現のための配列も含む。これらの遺伝子は、大腸菌W3110からPCRによってクローン化され、 λ t₀転写終結配列の下流に配置された。このプラスミドは、テトラサイクリンとアンピシリン耐性の両方を産生宿主に付与する。

【0045】

B. 細胞の形質転換

関係する株のコンピテント細胞を調製し、標準的な手順を用いて適切なプラスミドで形質転換し、うまく導入された形質転換体は、選択され、培地中で増殖させた。テトラサイクリン耐性のプラスミドに関し、形質転換体を20 μ g/mLのテトラサイクリンを含むLBプレート（LB+Tet20）からピックアップし、ストリークすることで単離し、DMSO中、-80℃で保存する前に、30℃のシェーカー/インキュベーター内、20 μ g/mLのテトラサイクリンを含むLBブロース中で増殖させた。30

プラスミドpxCD18-7T3及びpcyc34の場合、更なるプラスミド、pMS421がpxCD18-7T3又はpcyc34と共に同時に形質転換された。pMS421は、lacIqを過剰発現するpSC101ベースのプラスミドであるが、IPTGが抑制解除のために添加されるまでtacIIプロモーターの誘導を抑制し、また、スペクチノマイシンとストレプトマイシン耐性も付与する。このプラスミドは、lacIqサプレッサー染色体遺伝子の更なるコピー数を、lacIq株由来のそれ自身のプロモーターのコントロール下で提供するが、該遺伝子は適合性のあるプラスミドpSC101中に40
挿入される。

C. 抗体抽出

大腸菌細胞の可溶性画分は、20 μ Lの0.1 M EDTA (pH 8.0)及び10 μ Lのリゾチーム (6mg/mL)を含む500 μ Lの20 mM TRIS-HCL (pH8.0)中に、20 OD-mLの沈殿を懸濁することによって調製した。この混合物をボルテックスし、7-10パルスの超音波処理をし、その後、15,000 rpm、4℃で15分間遠心した。遠心後の上清画分は、高塩濃度抽出物（HSE）と称する。残りの沈殿は不溶性画分の解析に用いた。

【0046】

D. タンパク質の同定

Novex社の4-12%直線的濃度勾配アクリルアミド中で、一次元のSDS-PAGEゲル電気泳動を行50

った。特に、用いたシステムは、NuPAGE Bis-TRIS PreCast Gel（低から中位の分子量タンパク質のための）から構成されるNOVEX（登録商標）NuPageTMシステムであった。二次元ゲル電気泳動は、Champion等, Electrophoresis, 20 (4-5):994-1000(1999)に記載されているよう、Amersham Pharmacia Biotech社から購入した、一次元目が固定化pH勾配(pH3-10)、二次元目が直線的アクリルアミド濃度勾配(9-18%T)を用いて行った。タンパク質の同定は、銀ノクマシー染色、NH₂末端の配列決定及び質量スペクトル分析との組合わせを使用して行われた。分析ゲルに関して、大腸菌の細胞溶解物（～40 μgタンパク質）をChampion等, 上掲によって記載された再水和溶液と混合した。18cmのpH3-10の非直線的固定化pH勾配(IPG)ゲルストリップ（Amersham Pharmacia Biotech社）が、総電圧50,000V hの等電点電気泳動に用いられた。

10

分離用に行われたゲルは、製造者の記載により、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜（ProBlott; Applied Biosystems社）にブロットされた。アミノ末端の配列決定は、20分間のエドマンサイクルとPVDF-電氣的にブロットされたタンパク質の配列解析のための複数サンプル水平フローリアクターを用いて行われた（Henzel等, Analytical Biochemistry, 267:148-160 (1999)）。軽鎖特異的なスポットの分子量は、ゲルから溶出したMALDI-TOFマスマスペクトロメトリー及びキャピラリーLC-MSから見積もった（Champion等, 上掲）。

【0047】

E. 標的タンパク質種の測定

AME5TM-逆相デュアルカラムアッセイ（AME5TM/RPデュアル-カラムアッセイ）が、後述の如く、抗CD18F(ab')₂LZ力価測定に関して用いられた。

20

F. AME5TM/RPデュアル-カラムアッセイ

1. 器具と設備

INTEGRALTMワークステーション（PerSeptive Biosystems社製）が、デュアル-カラム勾配の構成中に設定された。調整された細孔ガラス（CPG）に固定化された抗軽鎖（κ）Fab抗体AME5TMを含むアフィニティーカラムが、標的タンパク質の捕獲のために使用された。逆相カラムは、温度が60℃にコントロールされ、捕獲された抗体種をさらに分離するために用いられた。活性化されたアルデヒドイムノアフィニティーレジン（AL-20）、逆相POROSレジン（R220）、及びカラム充填装置は、PerSeptive Biosystems, (Cambridge, MA, USA) から入手した。CPGが入っていないPEEKカラム、30 x 2.1 mm(100 μl)は、Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA) から購入した。大腸菌サンプルはACRODISCTM PF syringe 5-micron filters（Gelman Sciences社製）を用いてろ過した。

30

2. AME5TM抗ヒトκ Fab(his-gly)₄his-(lys)の精製

ここでは9.4 mMリン酸ナトリウム、136.9 mM 塩化ナトリウム、及び2.7 mM 塩化カリウムを含むリン酸緩衝溶液、pH7.2(PBS)が、装填バッファーとして言及される。モノクローナル抗体はマウスFab、AME5TM抗ヒトκ Fab(his-gly)₄his-(lys)₃を入手したが、これは大腸菌のペーストから精製され、ここでの目的のためにはAME5TM Fabhgkと称される。大腸菌のペーストは、27C7細胞の10リットル発酵から得られた。マイクロフリューダイザーは20 mM リン酸ナトリウム、0.25 M塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、及び2 mM イミダゾール pH7.0中に懸濁後細胞をホモジナイズするために用いた。その大腸菌の抽出物は、0.2%ポリエチレンイミン（PEI）の添加と遠心によって透明化した。透明化した抽出物は、イオン交換と固定化金属イオンキレーティング（IMAC）クロマトグラフィーステップの組合わせを用いて精製した。キレーティングSEPHAROSE FAST FLOWTMとSP SEPHAROSE FAST FLOWTMレジンは、Amersham Pharmaciaから入手した。

40

【0048】

3. 活性化グリセリルコート化CPGへのAME5TM Fabhgkの固定化

精製したFabは、親和性レジンを作るため、過ヨウ素酸で活性化したグリセリルコート化調整細孔ガラス（CPG）上に固定化された。AME5TM Fab hgk抗体は、活性化グリセリルコート化CPG上にRoy等, J. Chromatography, 303:225-228 (1984)の方法の変法を用いて固定化された。

50

乾燥CPGは精製水で湿潤化し、クロマトグラフィーカラム中に充填し、30分間、カラムに還元剤1%メタ過ヨウ素酸ナトリウム (Sigma S-1878TM) を再循環させることで活性化させた。その後、活性化されたレジンを、20 mM リン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム、pH7.2 (カップリングバッファー) 中で洗浄した。

1 µg/mLの還元剤であるシアン化ホウ化水素ナトリウム (cyanoborohydride) (Sigma S8628) を含むカップリングバッファー中、AME5TM FAb hgk抗体は、およそ5 mg/mLの密度で活性化されたレジンベッドを通して再循環させた。抗体のレジンへのカップリングは、280 nmの吸収の減少によってモニターした。吸収がもはや減少しない場合、残存している全ての抗体はカップリングバッファーで洗浄し、回収した。カップリング密度は、出発量と反応が完了した後回収された量の間の差により決定し、mg/mL FAb レジンで報告した。

次に、レジン上に残る全ての活性部位は、1 µg/mLのシアン化ホウ化水素ナトリウム (cyanoborohydride) の存在下で2時間1 Mエタノールアミン、pH8.0 (ICN, カタログ#151078) を再循環させることにより反応させた。次いで、保存用に0.01%チメロサル (GDL International) を含むカップリングバッファー中で洗浄した。如何なるタンパク質も装填される前に、レジンは平衡化と溶出バッファー間で3回予備交換させた。

【0049】

4. 試薬とアッセイ方法

溶媒の貯留槽は：溶媒1 A、アフィニティー装填バッファー；溶媒1 B、逆相液体バッファー及びアフィニティー溶出バッファー、水中0.1% TFA；溶媒2 A、水。溶媒2 B、逆相有機溶出バッファー、0.09%TFA/80%アセトニトリル。大腸菌50 µL (1:2に希釈) 又は装填バッファー中の発酵ブロースの上清がインジェクトされた。発酵細胞抽出物中に見出される抗CD18の全ての形態は、ブランクの2Dゲル泳動、生成物の泳動、及び生成物の泳動から得られた親和性捕獲 (AME5TM) された物質の比較によって決定されるように、このAME5TM 抗体によって捕獲された。非特異的吸収は、(PBSによる洗浄により) 減少し、親和性カラムは逆相カラムとインラインに配置され、捕獲成分は希釈酸の溶出によって移動された。これらの成分は、続いて、緩いアセトニトリルの勾配で逆相カラムを溶出することにより分離された。検出は280nmの吸収の測定により行われ、無傷の抗体は同様に処理したスタンダードのピークエリアと比較することにより定量した。

G. クロマトグラムのピークの同定

このアッセイにより、抗CD18断片が5つの抗体関連ピークに分類され、これらは以下の抗体断片を示す：

ピーク1：LC115 (κ 軽鎖の115アミノ酸分解産物)

ピーク2：未構築の遊離軽鎖及びグルタチオネート化軽鎖

ピーク3：軽鎖ダイマー

ピーク4：Fab様断片

ピーク5：Fab'2-LZ又はFab'2断片

精製された抗CD18F(ab)'2解離物の全体 (5mb/mL) をスタンダードとして使用した。49A5/pS1130の高細胞密度発酵 に由来する大腸菌抽出物は、-70℃で凍結させ、ポジティブコントロールとして使用した。全てのサンプルとの比較のために等質量の細胞を装填した。

【0050】

H. 全HC/LC POROSTM 逆相アッセイ

発酵により産生された軽鎖及び重鎖断片の全量を見積もるために、選択的な逆相HPLCアッセイ (RP-HPLC) が用いられた。全ブロース100 µLの全抗体発現物に、100 µLの0.2 M TRIS 8.0を添加した。10パルスで超音波処理した後、650 µLのグアニジンHCL/50 mM TRIS, pH9及び50 µLの2 M DTTを添加し、室温で15分間インキュベートした。カラムに装填する前に、200 µLのアセトニトリルが加えられ、サイズ排除スピンカラム (Pharmacia) を通してろ過した。この懸濁液5 µLをPOROSTM 逆相アッセイにより分析した。

逆相法については、HEWLETT-PACKARDTM 1100HPLCがPesperspectivePOROSTM R-1逆相カラムと共に用いられた。分析は60℃に加熱されたカラムで行われ、278 nmでのUV吸収がモニターされた。カラムは0.1%トリフルオロ酢酸を含む28%アセトニトリル水溶液中で平衡化された

10

20

30

40

50

。次に、25 μ Lのサンプルがカラムに装填され、溶出は20分間の28%~38%の直線勾配を使用して行われ、その後、95%アセトニトリルで17分間の再生を行い、28%アセトニトリルで平衡化した。軽鎖及び重鎖関連種のピークは、スタンダードとの比較及び確認のためのHEWLETT-PACKARDTM質量選択検出器による分析により同定された。プラスミドが重及び軽鎖の配列を含まないこと以外同じである宿主が使用された、ブランクランの発酵サンプルは、同様に調製され、分析のための適切なベースラインを決定するために分析された。ピーク面積の積分は、HEWLETT-PACKARDTM1100ソフトウェアを用いて行い、スタンダードは、サンプル中の色々な種の相対量を決定するためのキャリブレーションカーブを作成するためにブランクの実施サンプルにスパイクした。

【0051】

可溶性サンプルについて、溶解物はイオン交換アッセイの場合のように調製された。典型的には、100 μ Lのサンプルを650 μ Lの6MグアニジンHCl、50 mM TRIS-HCl、pH9で希釈した。次に、50 μ Lの2Mジチオスレイトール（新しく溶解させたもの）を添加し、200 μ Lのアセトニトリルを加え、HPLCにかける前に0.2 μ mのフィルターでろ過を行った。

また、不溶性溶解サンプルも、100 μ Lの0.2M TRIS 8.0中での細胞抽出後得られ、PBSで洗浄した不溶性沈殿を再懸濁し、十分に混合することにより同様に分析された。次いで、650 μ Lの6 M グアニジン-HCl/50 mM TRIS-HCl、pH9、50 μ Lの2MDTT及び200 μ Lのアセトニトリルを添加した。次に、サンプルをろ過し、10 μ Lのろ過したサンプルを可溶性溶解サンプルと同じ方法を用いて分析した。

【0052】

I. CSXアッセイ

抗CD18 Fab' 2 LZの消化をカチオン交換クロマトグラフィーのHPLCにより分析した。特に、サンプルは、少なくとも1 : 1に希釈し、Hewlett-Packard 1090 HPLCシステム上に55℃に保温したBAKERBONDJTMカルボキシスルホン（CsX）50 x 4.6-mmカラム（J.T. Baker, Phillipsburg, NJ）へ250 μ L装填した。サンプルはだいたい5から50mMのリン酸ナトリウム（pH7.0）の勾配を用い14分間かけて溶出し、ピークは278 nmのUV吸収を用いてモニターした。抗CD18 Fab' 2-ロイシンジッパーを含むピークが同定され、精製したスタンダードとの比較により定量化した。

【0053】

J. 株化細胞の構築

rhuFab' 2 LZ(xCD18)発酵に用いられた宿主は、大腸菌W3110に由来し（Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol.2 (Washington, D.C.:American Society for Microbiology, 1987), pp.1190-1219）、以下のようにデザインされる：49A5, 58B3, 59A7, 43H1, 58H2, 45F8, 41H1,及び33D3。図5は大腸菌株59A7, 49A5,及び43H1の誘導の模式図を示す。

1. 49A5株

49A5の完全な遺伝子型は、 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC2 degP41 (Δ pst1-Kan^r) IN(rrD-rrrE)1 ilvG2096(Val^r) Δ fucP Δ malEである。出発株である大腸菌W3110は、F⁻及び λ マイナスである大腸菌K-12の誘導体である。rrnDとrrnEとの間に染色体のインバージョンを持つことが示されていた（Bachmann, 上掲；Hill及びHarnish, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7069-7072(1981)）。fhuA遺伝子（前はtonAと称していた）は、Tn10の不正確な切り出しによりW3110から欠失され、その後にfhuA遺伝子中に挿入が施された。その結果得られた株である1A2は、バクテリオファージT1, T5及び ϕ 80に対して耐性を示す。

2つの欠損変異体、phoA Δ E15（Sarthy A.等, J. Bacteriol., 145:288-292 (1981)）と Δ (arg-lac)169（Schweizer等, Mol. Gen. Genet., 192:293-294 (1983)）は、proC遺伝子へのTn5挿入とリンクしたP1の同時形質導入によって1A2株へ同時に導入された。トランスポゾンの正確な切り出しは、porC遺伝子を修復した。phoA Δ E15変異は、アルカリホスファターゼの発現が消失しており、 Δ (argF-lac)169変異は、この株のlac⁻表現型の原因であり、7C1と称される。

10

20

30

40

50

deoC2変異は、デオキシリボースリン酸アルドラーゼの発現が消失しており、P1同時形質導入によって導入された。deoC遺伝子座は、遺伝学的にスレオニンの生合成遺伝子座とリンクしている。スレオニン栄養要求株は、Tn10の挿入及び不正確な切り出しによって作製された。次に、スレオニン栄養要求株は、P1ファージによって原栄養要求性へと形質導入され、deoC2変異へと生育させた。deoC2変異の存在は、出現した株、16C9の炭素源としての0.2%チミジン存在下での増殖不能性によって確認された。

degP41(Δ Pst1-Kan^r)変異は、ペリプラズムのプロテアーゼ遺伝子における変異であり、形質導入によって作製された。この変異体は、インビトロにおいてdegP遺伝子の部分をカナマイシン耐性遺伝子で置換することにより構築された (Strauch及びBeckwith, J. Bacteriol, 171:2689-2696 (1989))。これは、トランスポゾンではないが、カナマイシン耐性を用いて欠失の選択を可能にする。得られた株は、23E3と称する。

【0054】

ilvG2096(Val^r)変異 (Lawther等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:922-925 (1981)) は、同型遺伝子接合化 (homogenotization) によって導入された。この変異体は、野生型大腸菌K12がバリン感受性となる原因であるフレームシフトを修復する。23E3株は、ilvG2096(Val^r)マーカーとアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドpAH29 (Lawther等, 上掲) で形質転換した。33B6と称される株は、プラスミドを自発的に欠失し、望ましい対立遺伝子を獲得したもので、バリン耐性に対してアンピシリン感受性クローンのスクリーニングによって同定された。

最後に、炭水化物の利用経路における2つの変異は、この宿主を簡単な炭水化物利用試験によって他の組換え宿主と区別することを可能にするために導入された。fucPとmalEの欠失変異は、PCRによって構築され、 β -ラクタマーゼとレバンスクララーゼを含むプラスミドベクターに別個に導入された (Bass等, 上掲)。個々の全プラスミドは、プラスミドベクターの独立した複製をサポートしないW3110誘導体の染色体中に組換えられた。次に、33B6株は、P1ファージによってカルベニシリン耐性へと形質導入され、染色体に組込まれたfucP欠損プラスミドを持つW3110誘導体へと生育させた。もはやレバンスクララーゼを発現せず、スクロース耐性である誘導体を選択され、カルベニシリン耐性の消失とフコースの使用不能性によってスクリーニングされた。得られた49B2株は、PCRを用いて予定通りのfucP欠失を持つことを確認した。

これらのステップは、malE欠失を取り込むために繰り返された。49B2株は、P1ファージを用いてカルベニシリン耐性へと形質導入され、染色体中へ組込まれたmalE欠失プラスミドを持つ株へと生育させた。次に、スクロース耐性誘導体を選択され、カルベニシリン耐性の消失とマルトースの使用不能性によってスクリーニングされ、malE欠失の存在は、PCRによって確認された。

49A5株の重要な特徴は以下の点を含む：

- ・ T1ファージに耐性である。
- ・ リン酸塩を除去すると (産生物の合成を誘導するために使用される条件である)、アルカリフォスファターゼを過剰産生しない。
- ・ プロテアーゼを欠いている。
- ・ バリンの毒性の影響を受けない。
- ・ 炭水化物利用試験により他の宿主と区別することができる。

【0055】

2. 58B3株

また、58B3株は、33B6株から誘導された。 Δ prc::pS1080遺伝子型 (Bass等, 上掲; Metcalf等, Gene, 138:1-720(1994)) は、P1形質導入により33B6株(56G4)のkan^s誘導体へ形質導入され、低塩濃度で半強度 (half-strength) のLB中であまり増殖しないコロニーを42℃で選択した。kan^s株はpKS16 (Strauch及びBeckwith, 1989, 上掲) から誘導されるdegP欠失を保持し、その結果カナマイシン感受性表現型となる。従って、58B3株はdegP及びprc欠失の両方を保持するkan^s株である。

58B3株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC degP41 IN(r

10

20

30

40

50

rD-rrE)1 Kan^s ilvG2096(Val^r) Δ prcである。

3. 59A7株

この株は、Prcサブレッサー (Spr変異) を58B3株へ導入することによって構築される。51B9株 (tonA prc prc sup zeg722::Tn10) のP1ファージ溶解物は58B3株へと形質導入され、tet耐性コロニーについて選択し、Prcサブレッサー表現型 (低塩濃度で半強度 (half-strength) のLB中、42℃で増殖するコロニー) をスクリーニングした。新しい株は58F1と呼ばれる。Δ prc変異は42℃で生きられない。テトラサイクリン耐性遺伝子が、Malloyプレート上にプレーティングされることにより58F1株から除去され、その結果tet^s-感受性株が得られ、59A7と命名された。59A7株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC degP41 IN(rrD-rrE)1 Kan^s ilvG2096(Val^r) Δ prc sprW148Rである。オリジナルの51B9株は、43H1と59A7株のsprと同一の点突然変異W148Rを保持したPrcサブレッサーSprを持つ。

10

4. 43H1株

43H1株の完全な遺伝子型は、49A5株の遺伝子型と非常に似ている：W3110 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pst1-Kan^r) IN(rrD-rrE)1 ilvG2096(Val^r) ptr3 Δ ompT prc::kanr sprW148R。49A5より3つ多いプロテアーゼマーカ、Ptr3 OmpT及びPrcを保持する。この株は、Spr中に点突然変異(W148R)を持つ。Kan^rである。

5. 58H2

43H1が、P1ファージでtet^rに形質導入され、42E3株へと生育させた。この株(58F9)は、prc::kan^r変異について修復された；その結果kan^sとなった。次に、この株をeda::Tn10を除くために最小グルクロン酸培地上へプレートした。新規に作成された株、58H2は、kan^sで、野生型prcを持つ三重のプロテアーゼ変異体となった。58H2株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pst1-kan^r) IN(rrD-rrE)1 ilvG2096(Val^r) ptr3 Δ ompT sprW148Rである。

20

6. 45F8株

45F8株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhuA phoA Δ (argF-lac)169 degP41 kan^s Δ omp ptr3 ilvG2096(Val^r) phoS*(T104)である。これは、三重のプロテアーゼマーカを持つphoS株である。

7. 41H1株

41H1株の完全な遺伝子型は、37℃において適用化されたW3110 Δ fhuA phoS*(T104) Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pst1-kan^r) ptr3 ilvG2096(Val^r) Tである。これは、二重のプロテアーゼマーカを持つphoS株である。

30

8. 33D3株

33D3株の完全遺伝子型は、W3110 Δ fhuA ptr3 lacIq lacI8 Δ ompT degP41 (Δ pstI-Kan^R) である。作成に関する記載は、米国特許5,789,199号中に見出すことができる。

【0056】

K. 振盪フラスコ及び発酵培養

振盪フラスコ実験に関して、Luria-Bertani(LB)ブローとC.R.A.P.ミネラル培地を5 μg/mlのAMPICILLINETM抗生物質と共に使用した。C.R.A.P.ミネラル培地は、以下のように調製した：3.57g (NH₄)₂SO₄, 0.71g Na-Citrate-2H₂O, 1.07g KCl, 5.36g イーストエキストラクト, 5.36g HYCASE SF-SHEFFIELDTMを混合し、pHを7.3にKOHで調整し、体積を脱イオン水で872mLに合わせた。次に、この混合物をオートクレーブし、55℃まで温度を下げた。110mL 1M MOPS緩衝液pH7.3, 11mL 50% グルコース, 及び7.0 mL 1M MgSO₄を添加した。

40

ここで利用した大腸菌の発酵過程は、上述のように定義された高細胞密度過程であった。高い細胞密度に到達させるために、連続的にアンモニアを添加し、付加的に微量な栄養素 (P, K, S及びMg) を細胞の生育をサポートするために発酵のある段階で添加した。栄養素の総量を低くすると、産生物の質は同一であってより低いブローの最終的光学密度を持つ他の過程となり、ここでは低細胞密度過程として言及されている。

10-15% DMSOの1.5mLの培養物を含む単一のバイアルを、0.5mLのテトラサイクリン溶液 (5

50

mg/mL) と 2.5 mL 1 M リン酸ナトリウム溶液を添加した LB 培地、500 mL を含む 1 L フラスコ中で解凍させた。この種培養は、およそ 16 時間、30℃ で生育させ、次いで、10 リットル発酵槽へ植菌するために用いた。

最初、発酵槽は、約 4.4 g グルコース、100 mL 1 M 硫酸マグネシウム、10 mL の微量成分溶液（最終体積 1 L 中、100 mL 塩酸、27 g 塩化第二鉄 6 水和物、8 g 硫酸亜鉛 7 水和物、7 g 塩化コバルト 7 水和物、7 g モリブデン酸ナトリウム 2 水和物、8 g 硫酸銅 5 水和物、2 g ホウ酸及び 5 g 硫酸マグネシウム 1 水和物）、20 mL テトラサイクリン溶液（エタノール中 5 mg/mL）、10 mL FERMAX ADJUVANT 27TM（又は何れかの同等な抗発泡剤）、HCD 塩 1 バッグ（37.5 g 硫酸アンモニウム、19.5 g リン酸二塩基カリウム、9.75 g リン酸一塩基ナトリウム 2 水和物、7.5 g クエン酸ナトリウム 2 水和物、及び 11.3 g リン酸一塩基カリウム）、及び 20 10 0 g NZ アミン A（タンパク質の加水分解産物）を含むおよそ 6.5 L 培地から開始した。発酵は 10 slpm の気流で 30℃ にて行い、pH を 7.0 ± 0.2（しばしばこの範囲を超える偏位が、ある場合に生じたが）にコントロールした。発酵槽の逆圧及び攪拌速度は、発酵槽への酸素移送率を操作し、その結果として細胞の呼吸率をコントロールするために変動された。

【0057】

振盪フラスコからの細胞を含む培地で発酵槽に植菌した後、発酵槽中で高細胞密度になるまで、濃縮されたフルコース溶液を発酵槽へ送り込むためのコンピューターベースのアルゴリズムを用いて培養物を生育させた。また、水酸化アンモニウム（58% 溶液）と硫酸（24% 溶液）を pH を調節する必要のある発酵槽へ送り込んだ。また、ある場合には、さらなる添加剤である抗発泡剤も発泡をコントロールするために用いられた。培養物がおよそ 400 D55 20 0 の細胞密度に達したとき、さらに 100 mL の 1 M 硫酸マグネシウムが発酵槽に添加された。培養物がおよそ 200 D550 に到達したとき、さらに、濃縮された塩の発酵槽への送り込みを（1 L の水中、およそ 10 g 硫酸アンモニウム、26 g リン酸二塩基カリウム、13 g リン酸一塩基ナトリウム 2 水和物、2 g クエン酸ナトリウム 2 水和物、及び 15 g リン酸一塩基カリウムで構成される）2.5 mL/min の割合で開始し、およそ 1250 mL が発酵槽に添加されるまで継続された。発酵は、典型的には 72-80 時間の間続けられた。

発酵の間、発酵に対する溶解酸素の設定点に達すると、濃縮されたグルコース溶液が、設定点における溶解酸素濃度をコントロールするために溶解酸素プローブシグナルに基づいて送り込まれた。従って、このコントロールの図式において、攪拌速度又は逆圧などの発酵槽操作変数は、発酵槽の酸素移送能に影響を与え、それに呼応して、細胞の酸素摂取速 30 度又は代謝速度を操作した。

マススペクトル分光計は、発酵槽からのオフガス（off-gas）の組成をモニターし、発酵槽中の酸素摂取量と二酸化炭素の生成率の計算を可能ならしめている。

およそ 220 OD550 の細胞密度に培養物が達した場合、攪拌は最初速度 1000 rpm から約 725 rpm に減少させ、およそ 12 時間が経過した。

pMS421 と pcyc34（重及び軽鎖の両発現をコントロールするために、tacII プロモーターが使用された）で形質変換された細胞又は pMS421 及び二重プロモータープラスミド pxC18-7 T3（tacII プロモーターが重鎖発現をコントロールするために使用された）で形質転換された細胞の発酵については、pcyc34 に関する重鎖及び軽鎖合成を誘導するために、220 OD 550 の細胞密度に培養が到達したおよそ 12 時間後、50 mL の 200 mM IPTG が添加された。 40

【0058】

結果

A. 見出され、同定された κ 軽鎖切断産物

大腸菌の可溶性抽出物（材料及び方法中の HSE を参照のこと）及び SDS サンプルバッファー（一般に入手可能な SDS ゲルを泳動するための商品）中に懸濁された残りの沈殿を SDS-PAGE で解析した。サンプルは、 $\text{rhuF(ab)'}2\text{LZ(xCD18)}$ 産物のための pS1130 プラスミドを保持する 49A5 株の、大腸菌の高細胞密度（HCD）発酵の間に回収された 20 OD mL の沈殿に由来した。可溶性画分において、115 アミノ酸長の κ LC 切断断片が同定された。不溶性画分において、182 アミノ酸長の κ LC 切断断片が同定された。全ての断片は PVDF 膜に転写され、配列決定された。それら両方とも、 κ LC のプロセスされた形態として正しい N 末端を有してい 50

た。質量は、それぞれ、マスペクトロメトリー解析により、12488.5及び19857.2Daと決定された。タンパク質分解性の切断部位は、LC115に関してVal115とPhe116の残基間であり、LC182に関してSer182とLys183の残基間であった。唯一つのサイトが典型的なPrc切取り断片部位のようであった。

この発酵の終わりに、他の大腸菌の20 OD-mLの沈殿が二次元ゲル電気泳動によって解析された。沈殿の大腸菌細胞溶解物（～40 µgタンパク質）は、Champion等、上掲によって記載されたように再水和溶液に混合した。49A5/pS1130発酵槽に由来する細胞の2-Dゲルのパターンにおいて、κ-軽鎖特異的なスポットは、同様の時点における（49A5/pBR322）の細胞沈殿に由来するブランクの2-Dゲルと産物のゲルとを比較することにより同定された。沈殿は、2つの発酵槽の同一時点から選ばれ、細胞は比較し得る代謝状態にあったと想定できる。全てのκ LCスポットは、アルカリホスファターゼ結合抗ヒトκ LC抗体を用いてイムノプロットにより同定された。

1-Dゲル解析により同定された2つの主な切取り断片の他に、2-Dゲルは、無傷のLC、無傷のLCのアイソフォーム、そして少なくとも5より多いマイナーなLC-切取り断片を示した（図6を参照のこと）。対応するスポットは溶出され、配列決定された。全てのLC特異的なペプチドは正しいN末端を有しており、それらは全て切断されたSTIIシグナルによってうまくプロセスされていた。これらのペプチドの全ては、マスペクトロメーターにより、およそその質量を測定するために解析された。マイナー切取り断片が微量のため、これらの断片の切取り部位を決定するための正確な質量は得られなかった。

3つのマイナーな切取り断片は、9付近のpIでκ LC-115についてクラスターを形成した。4つ目は、6.5付近のpI値を有し、5つ目は、6付近のpIでLC-182切取り断片と同じpI値を有していた。これらのLC断片の可溶性を決定するために、同一の沈殿のHSEを2-Dゲルで泳動した。LC182断片は、不溶性画分にのみ存在した。

【0059】

B. Prcは、κ 軽鎖の切断の原因となる唯一のプロテアーゼである。

抗CD18 Fab' 2LZ分子を発現する大腸菌のプロテアーゼ変異体である、49A5、45F8、41H1及び43H1の4つの異なる発酵に由来する不溶性細胞画分について、1-D SDS-PAGEゲルを行った。LC-182タンパク質分解性切断は、4つのサンプル中3つに存在しており、（prc欠失43H1株中にはない）このことはPrcプロテアーゼがκ LC切断に関与することを示唆した。ピーク1は、LC-115切取り断片に相当し、49A5株（prc-プラス）に由来するサンプル中に存在し、また、AME5TM/RPデュアルカラムアッセイによって分離されたクロマトグラフを比較した場合、43H1由来のサンプルからは消失した。このアッセイは、κ LCを含む抗体種を選択的に吸着し、次に、材料及び方法のセクション中、上述されるように、それらは5つのピークに分離された。

43H1由来の細胞沈殿の2-Dゲルが解析されると、LC-115及びLC-182断片がゲルから消失するばかりでなく、他のLC関連のマイナーな種も消失したことを見出した（図7を参照のこと）。この結果は、Prcがκ-LC切断の原因となる唯一の酵素であることを強く示唆する。この43H1細胞沈殿は、低細胞密度発酵に由来した。

【0060】

C. Prcはκ 軽鎖切断に関与する唯一の酵素であることを確認するための株の構築

1. prc-プラスになるためのprc欠損株

Prcがκ LC切断に関与する唯一の酵素であるという証拠は、43H1株（四重のプロテアーゼマーカーを持つprc-マイナス宿主）が三重プロテアーゼ株（58H2）prc-プラスになるように修復することにより得られた。42E3株はeda-51::Tn10を保持し、prcと共に同時形質導入できる。43H1株は、P1ファージによりtet^rへ形質導入され、42E3へと生育された。結果的に生じた株（58F9）は、prc::kan^r変異について修復された；従って、kan^sになった。この株は、次に、eda::Tn10を除去するために最小グルクロン酸培地上にプレートされた。新規に作成された株、58H2は、野生型prcに対して三重プロテアーゼ変異となった。この単離体は、形質導入体又は自発的Eda⁺単離体である。prc-プラス遺伝子型は、PCRによって確認された。この58H2株は、すでに、43H1に由来するprcサプレッサー（spr^{W148R}）

を保持しており、kan^sである。この58H2株においてLC切取り断片が再度出現したことがAM E5^{T^M}/RPデュアルカラムアッセイによって検出された（図8を参照のこと）。

2. prc遺伝子はprc-マイナスになるように天然の株から欠失された。

49A5株は、上述のごとく、prc野生型株であった。prc欠失が、58B3株を構築するためにこの株のバックグラウンド中に導入され、細胞抽出物がAME5^{T^M}/RPデュアルカラム法によりアッセイされたとき、LC-115切取り断片（ピーク1）は消失した。58B3株は33B6株に由来し、プロテアーゼマーカー、DegPのみを保持する。Δprc::pS1080（Bass等，上掲；Metcalfe等，上掲）は、degPΔprcデュアルプロテアーゼ株、59A7を作成するためにP1形質導入により33B6(56G4)のkan^s誘導体中へ導入された。

7つ全ての株に関する切断結果のまとめを表1に示す。

【0061】

【表1】

表1:抗-CD18F(ab)'2ロイシンジッパーを発現する大腸菌宿主株

大腸菌宿主	プロテアーゼマーカー	LC分解
49A5	DegP	+
45F8	DegP Ptr3	+
41H1	DegP Ptr3 OmpT	+
43H1	DegP Ptr3 OmpT ΔPrc Spr ^{W148K}	-
58H2	DegP Ptr3 OmpT Spr ^{W148K}	+
58B3	DegP ΔPrc	-
59A7	DegP ΔPrc Spr ^{W148K}	-

【0062】

D. prc-マイナス宿主中のrhuFab'2LZ(xCD18)の収量の改善

1. 振盪フラスコの結果

rhuFab'2LZ(xCD18)を発現する3つの株（49A5，43H1，及び58H2）は、最初、LBブロー+ Amp中で30℃、一晚生育させた。次に、全ての培養物を、25mLのC.R.A.P.最小培地+ Ampを含む振盪フラスコ中へ等しく植菌し、30℃で一晩振盪を続けた。20 OD-mLの沈殿を、可溶性抽出物（HSE）を調製するために回収した。530 μl中25 μlをAME5^{T^M}/逆相カラムにか

けた。
図8は、このアッセイにより分離された5つのピークを示す棒グラフを示す。Y軸はピーク1から5の特異的なピーク領域である（材料と方法を参照のこと）。X軸は、rhuFab'2LZ(xCD18)産生株を示す。Δprc株（43H1）の、ほとんどないピーク1とより高いピーク5の産物と比較して、prc+株である49A5及び58H2は共に、ほぼ同量の産物を産生し、それら両方ともほとんど同量のLC-115断片（ピーク1）を示した。このグラフは、抗体断片の分配を示した。より多くの可溶性で、無傷のLC及びLCダイマーは、49A5及び58H2宿主中よりも43H1宿主中で観察された。振盪フラスコ中、prc-宿主は、天然のprc株よりほぼ5倍以上のrhuFab'2LZ(xCD18)産物を産生した。

【0063】

2. 発酵結果

標準的な高細胞密度（HCD）発酵によって得られた平均のrhuFab'2LZ(xCD18)の力価は、AM E5^{T^M}/RPデュアルカラムアッセイに基づく、野生型prc宿主中（49A5，n=6）で893 mg/Lであった。2倍近い力価の改善が、43H1/pS1130発酵から得られた。43H1と49A5宿主に関する振盪フラスコ（x5）と発酵（<又はほぼ2x）の力価の差は、それぞれ、なんら一つの理論に限定するわけではないが、おそらく産物の分泌効率の差によるものであった。振盪フラスコ沈殿の全抽出物を解析したとき、抗体断片の50%のみがprc-プラスのバックグラウンドにおいて正確にプロセスされたが、43H1の振盪フラスコ細胞又は全ての発酵由来細胞（prc-プラス及びマイナス）に由来する抽出物は、100%のプロセッシングを示した。Pr cタンパク質のプロセッシングは、secY、secA依存性（Hara等，1991，上掲）であること

10

20

30

40

50

が見出された。なんら一つの理論に限定するわけではないが、振盪フラスコの結果は、Pr cタンパク質が、移行のために、抗体断片と競合したことを示すと考えられる。

【0064】

3. 抗体断片の総発現が測定された。

全ブローズ発酵サンプルのPOROSTMカラムアッセイは、抗体の折り畳み及び集合の効率を評価するために、材料と方法のセクションに記載されるように開発された。3つの抗CD18

HCD発酵由来の全ブローズサンプルの等しい量のインジェクションを、異なる宿主において比較した場合、43H1発酵は、49A5発酵とほぼ同量のHCを発現するが、より多くの無傷のκ-LCであることが見出された（表2を参照のこと）。rhuFab'2LZ(xCD18)の力価は、49A5の887.8mg/Lと比較すると、43H1について1830 mg/Lであった。59A7の発酵は、余分な抗体断片を発現させるだけでなく、結果として2403mg/Lのより高いrhuFab'2LZ(xCD18)の力価を生じた。

【表2】

表2:標準的HCD発酵過程によりrhuFab'2LZ(xCD18)を発現する異なる株の抗体断片の総発現及びFab'2-LZ力価

発酵サンプル	宿主	総LC (g/L)	総HC (g/L)	総HC+LC (g/L)	Fab'2-LZ (mg/L)	時間 (hr)
1	49A5	2.23	2.27	4.5		40
2	"	4.75	3.96	8.71	887.8	72
3	43H1	6.57	4	10.57		62
4	"	7.38	4.18	11.56	1830	72
5	59A7	12.49	6.87	19.36		68
6	"	13.76	7.46	21.22	2403	72

【0065】

E. Pr cサプレッションは定常状態での生存に必要である。

degPとprc欠失を持つ58B3株は、抗CD18 Fab'2LZ分子を発現するHCD発酵の長期の定常状態の間に溶菌を示すことが見出された。細胞溶解は、植菌後50時間で開始した。それは、rhuFab'2LZ(xCD18)の320mg/Lのみを産生したが、59A7/pS1130発酵は、高細胞密度（約300 0 D₅₅₀-mL）に達するためのHCDの72時間まで、定常状態において良好な生育を維持した。図9はこれら2つの発酵の生育比較を示す。また、この株のバックグラウンドにおいて、HCとLC断片の余分な高発現が見出され、rhuFab'2LZ(xCD18)分子の収量が2403mg/Lまで増大した。また、κLC切取り断片は、58B3及び59A7prc-欠損株の両方に由来するサンプル中には見出されなかった。

prcサプレッサー(spr) (Pr c^{spr}をコードする)は、元々ここで、自発突然変異、即ちprc欠損変異体の温度抵抗性復帰変異体として、40A6株 (prc::kan spr) から単離された。遺伝子は配列決定され、結合マップされたのち、大腸菌染色体上のおよそ48分に位置することが見出された。そのPCR産物のヌクレオチド配列は、TGGコドンがCGGに置換され、結果的にトリプトファン残基からアルギニンへの置換となる (W148R) アミノ酸148における一つの点突然変異を除いて、Hara等, 1996, 上掲によって報告される大腸菌spr遺伝子の配列と一致した。このprcサプレッサーは、59A7株中に導入された場合に、W148R変異を有した。野生型spr遺伝子は、膜画分中でリポタンパク質をコードすることが報告され、ペプチドグリカン加水分解酵素であると思われる (Hara等, 1996, 上掲)。

prcサプレッサーは、このサプレッサーとリンクしたTn10によって59A7株中に導入され、

同時形質導入体がテトラサイクリン耐性及び42℃の半強度 (half strength) LB低塩プレート上で生育可能であることの両方に関して選択された。Tn10がM11oyプレートによって除去されたとき、新規点突然変異が生じた。

59A7株に対する58B3の抗CD18 Fab' 2発酵の結果に基づいて、Prcサブレッサーは、首尾良く生育するにはΔ Prc変異が、特に高細胞密度の大腸菌発酵中で必要であることが示された。58B3と称される株は、spr(W148R)を除いて59A7と厳密に同一である遺伝子型を保持し、標準的な50時間後のHCD発酵中では、生存可能な状態ではなかった。

【0066】

F. Prc欠失変異は、Prc切り取り断片部位の位置に起因する種々の抗体産生レベルを増大することができる。

図10はヒト化κ LC配列 (配列番号: 5) を示す。潜在的なPrc切り取り断片の計算上のpI値は表3に示してある。

【表3】

表3:潜在的Prc切り取り断片の計算上のpI値

計算上のpI値	切断部位	プロテアーゼタイプ	LC-切り取り断片
5.97	S/K	セリン特異的	LC-182
9.14	V/F	Prc	LC-115
9.14	S/V	セリン特異的	LC-114
9.14	V/A	Prc	LC-110

なんら一つの理論に限定するわけではないが、図10及び表3によると、Prcプロテアーゼは、そのC末端の9又は18のアミノ酸からκ LCをLC配列中に切取ることを開始し、その後徐々にセリン特異的プロテアーゼが機能するようにS/K部位を露出させるためにN末端方向へと進行した。他のκ LC種 (おそらく異なる折り畳み状態で) が主に115アミノ酸まで切断を受けることは可能であった。多くの潜在的な切断産物は、2-Dゲルから見出されたκ LCのスポットと極めよく一致する分子量と計算上のpI値を持つ。

図11は、prc欠損株 (43H1) は、抗VEGF Fab、抗CD18Fba' 2LZ、抗CD18Fab' 2-LZ-6xHis分子及び抗組織因子Fab' 2-LZ-6xHis分子を発現する細胞由来のLC-182切り取り断片を除去することを示す。cab2826(33B6/D3H44-F(ab')₂)及びcab2847(43H1/D3H44-F(ab')₂)由来の発酵サンプルは、抗組織因子Fab' 2LZ-6xhis分子を発現することを目的とする高細胞密度発酵であった。発酵過程は、抗CD18 Fab' 2LZ発酵に関し上述されるような同一の標準的なHCD過程であった。Cab2793は、抗CD18Fab' 2-LZ-6xHis分子を発現することを目的とする49A5/pAB3発酵であった。Cab2846は、抗CD18Fab' 2-LZ分子を発現することを目的とする41H1/pS1130発酵であった。JJ81(43H1/pY0317)及びJJ67(43E7/pY0317)発酵は、抗VEGF Fabを作成することを目的とした。Cab2814は (49A5/pBR322) で、ブランクの発酵であり、抗体発現遺伝子を持たない類似のプラスミド骨格を含む。

【0067】

20-0Dの発酵沈殿は、TRIS/EDTA/lysozymeを用いて可溶性のHSEsを除去するために抽出された。残りの沈殿は、20μLのβメルカプトエタノールを加えた1xSDSサンプルバッファー、400μL中に懸濁し、その後、5分間ヒートブロック上、95℃でヒートした。次に、5μLを4-12%のNUPAGETMゲル中で泳動した。33B6、41H1、49A5及び43E7株は、prc-プラス株である。43H1株はprc-マイナス株であった。全ての天然のprc-株由来のサンプルは、19.8-kDのLC分解産物を有する。cab2829(33B6/pD3H44TB)発酵サンプルは、抗TF Fabを発現し、また、同じサイズのLC分解断片も検出する。これらの断片のすべてはアミノ酸配列決定が行われ、それらの正確なN末端LC配列を有することが見出された。

G. 59A7株は、抗CD18 His-及びLys-タグ化Fab' 2 LZ及びApo2L細胞質タンパク質に関し、振盪フラスコで優れた発現を示す

表4中に示される更なる振盪フラスコに関するデータは、59A7株が43H1及び49A5よりpAB3

(抗CD18 His-タグ化Fab'2 LZ)を多く発現することを示す。59A7株は、33B6よりpAB21 (Lys-タグ化Fab'2 LZ)を2.4倍多く発現した。59A7及び43H1株は、49A5株よりpS1130 (タグ化の無いFab'2 LZ)を2.9倍多く発現した。しかし、発酵槽の結果は、常に、59A7株が43H1株よりpS1130の発現において優れていることを示した。

抗体ではない細胞質タンパク質であるApoL2に関し、59A7株中で発現される場合、43E7株より比活性が約20-30%高い(振盪フラスコにおいて)。43E7株はより高いOD550値まで生育したため、総発現量は同等であった。43E7株は、prc及びsprを保持しないompT ptr3 degP株である。

【表4】

表4: 振とうフラスコ培養中にて、59A7及び他の株で発現される種々のタンパク質のより高度な特異的力価

株	プロテアーゼマーカー	pS1130 mg/L/OD- mL	pAB3 mg/L/OD- mL	PAB21 Mg/L/OD- mL	Apo2L mg/L/OD-mL
33B6	DegP	N.A.	N.A.	0.33	N.A.
49A5	DegP	0.38	0.46	N.A.	N.A.
43H1	DegP Ptr3 OmpT Prc Spr ^{W148R}	1.1	0.3	N.A.	N.A.
59A7	DegP Spr ^{W148R}	1.1	0.7	0.8	14.4 15.2
43E7	DegP Ptr3 OmpT	N.A.	N.A.	N.A.	12.2 11.4

【0068】

H. 59A7株は、抗CD18 Fab'2LZに関し発酵により優れた発現を示す

表5は、59A7株がデュアルプロモータープラスミドpxCD18-7T3由来の抗CD18 Fab'2 LZの発現に関し33D3よりも優れており、プラスミドpcyc34由来の抗CD18 Fab'2 LZの発現に関し49A5よりも優れていたことを示す。

【表5】

表5: 発酵による2つの異なるプラスミドを用いた33D3及び49A5と比較した59A7中で発現される抗CD18Fab'2LZのより高度な特異的力価

株	プラスミド	CSXアッセイによる抗CD18Fab'2LZ力価(mg/L)(平均)
33D3	pxCD18-7T3/pMS421	2500
59A7	pxCD18-7T3/pMS421	4000
49A5	pcyc34/pMS421	341.3
59A7	pcyc34/pMS421	2067.1

【0069】

考察

この研究において、抗CD18 Fab'2-LZ分子を発現する大腸菌細胞中のκLCの分解について詳細に調べられた。すでに行われた研究により、多くの潜在的なPrc基質が示されていたが、確認されるかぎりでは、このプロテアーゼの基質としての抗体断片の発見について報告した者はいなかった。ここにおいて、Prcは大腸菌細胞内においてκLC切断に関与する唯一のプロテアーゼであることが示されている。Prcタンパク質は、分離した位置におい

て選択的に κ LC を切断するようであり、2-Dゲルの結果に示されるように、2つの主要な切取り断片 (LC-115及びLC-182) と、5つの更なるマイナーな切断産物を生じさせた。主要な切取り断片の一つは、S/K断片産物であり、Prc切取り部位 (Keiler等, 上掲) の特徴に一致しなかったため、さらに詳細に調べられた。現段階において、大腸菌細胞中での κ 軽鎖の分解は、大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ (Prc/Tsp) に関係することが見出された。 κ 軽鎖切断産物は、抗CD18F(ab')₂ロイシンジッパー分子を発現する種々のタンパク質分解欠損性株由来の大腸菌抽出物の分析的な方法 (1-D/2-D SDS PAGE, マススペクトロメトリー、及びN末端配列決定解析) によって同定され、Prc/Tspは κ 軽鎖断片の原因である唯一のプロテアーゼであることが見出された。

prcサプレッサー (spr突然変異) とdegP prc欠失との特定の組み合わせは、Apo2リガンドと活性のある抗体によりここで例示されるように、かなり多量な組換えタンパク質又はタンパク質の高い比活性を産生することができる唯一の大腸菌株であることが見出された。ここでのdegP prc spr株を用いた発酵槽は、高細胞密度増殖 (300 ODまたはそれより高い値まで) で、野生型株又は他のタンパク質分解欠損性株中での抗体の発現と比較して、rhuxCD18 Fab'2ロイシンジッパー産物に関して高い収量を産生することになる。

【0070】

ここでの発酵過程により、degP prc sprの組み合わせを保持する1つの好ましい59A7株中で産生される活性な抗体について、200%を超える増加による乾燥重量100-200g/Lの産生を可能ならしめる。59A7株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhua phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 degP41 IN(rrD-rrE)1 kan^s ilvG2096(Val^r) Δ prc spr^{W148R}である。その親株は、58B3であり、prcサプレッサーであるsprを保持しないことを除いて59A7株と同一の遺伝学的マーカーを持つ。58B3株は、大腸菌の高細胞密度発酵過程の定常相において生育を維持することができなかった。それは、天然のprc株 (49A5) より低い量の抗体産物を産生し、また、49A5がカナマイシン耐性prc天然株であるのに対して59A7株がカナマイシン感受性 Δ prc株であることを除いて、degP欠失マーカーとその他59A7株と同一の遺伝子型も保持する。

従って、この結果により、prcサプレッサー(spr)の存在は、degP prc欠損株中、低細胞密度発酵過程ではなく、特に、高細胞密度発酵過程において良好な生育及び高いレベルでの抗体の産生に必須であることが明らかとなった。

DegP Δ 単一プロテアーゼ変異とdegP Δ を含む他の多重性プロテアーゼ欠損株は、さらに高いレベルの組換え産物を産生することはなかった。以前から言及されていた2つの株、degP rpoHとdegP prcは、それらと比較される他の多くの株より多くの産物を発現したが、59A7株ほどではなかった。より特別には、sprサプレッサーなしで、degP prcの組み合わせを持つ58B3株は、抗CD18 Fab'2 LZ分子によって例示されるように、抗体断片の産生においてなんら利点を示さなかった。

分析結果から、ヒト化抗CD18 F(ab')₂ロイシンジッパー分子を発現する大腸菌細胞 κ LCの切断は、ペリプラズムでのC末端プロセッシングタンパク質 (Prc) に関係することが証明された。Prcタンパク質は κ 軽鎖の切断に原因となる唯一のプロテアーゼであり、このことは、二次元ゲル電気泳動と抗体産生株の遺伝学的操作の両方により証明された。Prcプロテアーゼが真に κ LC切断に関与する唯一の酵素であることを確認するために、 Δ prc株が天然prc株へ修復されたとき、 κ LC切断産物が再度生じた。同様に、prc遺伝子が天然prc株から欠失されたとき、LC切断産物は消失した。両方の株の構築は、P1形質導入によって実施された。

【0071】

さらに、prc欠失の有無により、大腸菌タンパク質分解変異体由来の抗CD18 F(ab')₂ロイシンジッパー分子力価の比較が提示された。このデータにより、59A7株が抗体発現に関し高い産生株であることを証明された。抗CD18 F(ab')₂-ロイシンジッパー分子を発現するために構築された種々の核酸について記載されている；59A7株中に形質導入された全ての発現プラスミドは、degP Δ 単一プロテアーゼ変異又はsprを持たないdegP prc変異と比較した場合、より多くの量の抗体断片を産生した。他の株である43H1は、ompPとptr3変異に

10

20

30

40

50

加え、遺伝子型 degP prc spr を有し、59A7 ほど増殖しないが、43H1 株は 59A7 と同じ spr 変異、つまり、520 の位置において T から C への置換を含み、その結果、148 の位置においてアミノ酸 W から R への置換が生じた。それは、degP 株 (49A5) によって産生されるよりも高い力価を持つ抗 CD18 Fab' 2LZ を産生するが、発酵槽中で 59A7 株により産生されるほど高くはなかった。

Prc プロテアーゼは、広い配列特異性というよりは、多くの別々の部位においてその基質を切断することが報告されていた (Keiler 等, 上掲)。ここで、 κ LC 断片中の Prc 切断部位は、異なるヒト化抗体発現プラスミドを構築するために一般的に用いられる骨格配列である定常領域中に配置されることが見出された。ここでの結果に基づいて、Prc 欠失変異は、大腸菌細胞内で発現される、全長抗体を含む Fab, Fab', Fab' 2 (ロイシンジッパーを有する又は有さない) などの種々の抗体断片の力価を改善するであろうことが期待できる。HC の C 末端において、His タグ又は Lys タグ配列に隣接される抗体断片が有益であることも期待される。

59A7 株は、pAB3 を発現する 49A5 株より優れており、振盪フラスコ中での Apo2L 細胞質タンパク質の特異的な発現において 43E7 株より優れており、発酵槽による pS1130 及び pcy34 (pS1130 の tacII プロモーター対応物) の発現において 43H1 及び 49A5 より優れている。さらに、それは、デュアルプロモータープラスミド pxC18-7T3 を発現する 33D3 株より優れていた。

【0072】

実施例 2

材料と方法

A. 発現プラスミド

プラスミド D3H44-F(ab')₂ は、実施例 1 中に記載されている。

プラスミド pY0317tet20 は、実施例 1 中に記載されている。

B. 株

xVEGF Fab の発現に使用される株は、実施例 1 に記載される他の株に類似する。それは、大腸菌 W3110 から誘導されたもので、60C1 株と命名されている。60C1 株の完全な遺伝子型は、W3110 Δ fhuA Δ (argF-lac)₁₆₉ ptr3 degP41 Kan^s Δ ompT ilvG2096(Val^r) Δ (nmpc-fepE) Δ ssrA である。45F8 株と同様に、それは prc を持たない三重プロテアーゼマーカースを保持する。

株 43H1, 59A7, 及び 33B6 は全て実施例 1 中に記載されている。

C. 培養方法

振盪フラスコ中での培養は、実施例 1 に記載されているように実施された。xTF Fab' 2LZ-6x his 分子を発現する振盪フラスコ培養の増殖は、30℃ で 42 時間まで延長され、2 セットのサンプルが比較のために異なる成長段階の時点で採取された。xVEGF Fab 発現との比較のため、二連の培養を増殖させ、24 時間の時点でのみ採取された。

【0073】

D. タンパク質の同定

2-D ゲル電気泳動は、実施例 1 に記載されるように行われた。

結果

振盪フラスコ培養のデータは、以下の表 6 中に示されている。rhuFab' 2LZ (xCD18) 産生に関しては、実施例 1 中において明確であるように、Prc-43H1 及び 59A7 株が Prc+ 株 60C1 及び 33B6 よりも、産生される産物 (抗 VEGF Fab' 及び抗組織因子 Fab' 2 LZ-6xhis) の量において優れていた。

図 1 2 は、抗 VEGF Fab を発現する (pY0317tet20) prc 欠失 (59A7 株, prc-マイナス株) は、分解された抗 VEGF LC の全てと 2 つの分解された xVEGF HC 断片 (prc-プラス株中に見出された) を除去するが、OmpT 又は Ptr3 切断産物である 2 つの別々の HC 切り取り断片は 59A7 中に認められた。図 1 3 は、異種のポリペプチドとして、抗 VEGF Fab (pY0317tet20) を発現する 60C1 株 (prc-プラス株) は、複数分解された抗 VEGF LC と 2 つの分解された HC 断片を含んでいたことを示す 2-D ゲルである。

10

20

30

40

50

【表 6】

表6: *prct*^{-/-} 宿主中のxVEGFと*prct*^{-/-} 宿主中のxTF Fab'2LZ-6xhis発現を比較する振とうプラスコデータ

株	24時間培養	42時間培養	<i>prst</i> 状態
抗-VEGF Fab (mg/L/OD)			
59A7/pY0317tet20	2.44		-
59A7/pY0317tet20	2.53		-
60C1/pY0317tet20	0.82		+
60C1/pY0317tet20	1.03		+
抗-TF Fab'2 LZ-6xhis (mg/L/OD)			
33B6/pd3h44f2	0.68	0.54	+
43H1/pd3h44f2	1.60	1.88	-
59A7/pd3h44f2	2.18	3.98	-

10

【図面の簡単な説明】

20

【0074】

【図1A】図1Aは、抗VEGF Fabの産生プラスミドであるpY0317の調製のための発現カセットの完全なヌクレオチド及びコードされるアミノ酸配列（各々配列番号：1及び2）を示す。太文字の残基は元のマウスA.4.6.1抗体由来のCDR残基を示す。イタリック体及び下線は、抗原結合に必要なマウスフレームワーク残基を示す。

【図1B】図1Bは、抗VEGF Fabの産生プラスミドであるpY0317の調製のための発現カセットの完全なヌクレオチド及びコードされるアミノ酸配列（各々配列番号：1及び2）を示す。太文字の残基は元のマウスA.4.6.1抗体由来のCDR残基を示す。イタリック体及び下線は、抗原結合に必要なマウスフレームワーク残基を示す。

【図1C】図1Cは、抗VEGF Fabの産生プラスミドであるpY0317の調製のための発現カセットの完全なヌクレオチド及びコードされるアミノ酸配列（各々配列番号：1及び2）を示す。太文字の残基は元のマウスA.4.6.1抗体由来のCDR残基を示す。イタリック体及び下線は、抗原結合に必要なマウスフレームワーク残基を示す。

30

【図1D】図1Dは、抗VEGF Fabの産生プラスミドであるpY0317の調製のための発現カセットの完全なヌクレオチド及びコードされるアミノ酸配列（各々配列番号：1及び2）を示す。太文字の残基は元のマウスA.4.6.1抗体由来のCDR残基を示す。イタリック体及び下線は、抗原結合に必要なマウスフレームワーク残基を示す。

【図1E】図1Eは、抗VEGF Fabの産生プラスミドであるpY0317の調製のための発現カセットの完全なヌクレオチド及びコードされるアミノ酸配列（各々配列番号：1及び2）を示す。太文字の残基は元のマウスA.4.6.1抗体由来のCDR残基を示す。イタリック体及び下線は、抗原結合に必要なマウスフレームワーク残基を示す。

40

【図2A】図2Aは、pY0317（図2A）並びにpY0317tet20（図2A及び2B）のプラスミド構築の図解を示す。

【図2B】図2Bは、pY0317（図2A）並びにpY0317tet20（図2A及び2B）のプラスミド構築の図解を示す。

【図3】図3は、pAPAp2-P2RUのプラスミドの図解を示す。

【図4】図4は、ヒトApo-2リガンドcDNA（配列番号：3）のヌクレオチド配列及びその誘導アミノ酸配列（配列番号：4）を示す。ヌクレオチド位置447の「N」（配列番号：3）は、ヌクレオチド塩基が「T」又は「G」であることを示すために用いられる。

【図5】図5は、大腸菌株59A7、49A5、43H1の誘導体の図解である。

50

【図 6】図 6 は、異種のポリペプチドとして rhuFab'2 抗-CD18-LZ 融合体を発現させる、株 49A5(prc-プラス株)に由来する発酵細胞沈殿の 2-Dゲルの結果を示す。全ての LC 関連スポットは円で囲んで示す。

【図 7】図 7 は、異種のポリペプチドとして rhuFab'2 抗-CD18-LZ 融合体を発現させる、43H1株(prc-マイナス株)に由来する発酵細胞沈殿の 2-Dゲルの結果を示す。このゲルでは、LC 切断産物は消失している。

【図 8】図 8 は、AME5TM/逆相カラムを用いるアッセイによって分離された 5 つのピークを示すが、その結果として、このように分離された rhuFab'2LZ (xCD18) 抗体断片の部分の比較を提供する。y 軸はピーク 1 から 5 の特定のピーク面積である。x 軸は 3 つの rhuFab'2LZ (xCD18) 産生株である 43H1(prc-)、49A5(prc+)及び 58H2(prc-修復 43H1)を示す。太い境界線の灰色のバーは LC-115; 黒色のバーは LC; 白色のバーは LC 二量体; 細い境界線の灰色のバーは Fab 様分子; 及びブリック様模様のバーは Fab'2-LZ である。ピーク 1 (LC-115) は、prc 欠損株からは消失したことが分かる。

10

【図 9】図 9 は、発酵時間の関数とし、OD550 で表現された変異型 spr 遺伝子 (pS1130 で形質転換させた 58B3) (四角) を持たない prc-マイナス及び変異型 spr 遺伝子 (pS1130 で形質転換させた 59A7) を持つ prc-マイナス (菱形) 株の高い細胞密度発酵槽の生育プロフィールを示す。

【図 10】図 10 は、想定される LC 分解産物の計算上の pI 値を持つヒト化抗-CD18 κ LC 配列 (配列番号: 5) を示す。スラッシュで表示される切断は、マススペクトロメトリーによって確認された。以下の表 3 を参照のこと。

20

【図 11】図 11 は、異なる宿主と 3 タイプのタンパク質を用いた 7 つのレーンを持つゲルを示す。このゲルは、20-kD LC 切取り断片 (LC 182) は抗-VEGF Fab 及び抗-組織因子 Fab'2-LZ 融合分子を発現する 43H1(prc-)細胞中に存在しないことを示す。レーン 1 は抗-組織因子 F(ab')₂ LZ 6xHis、宿主株 33B6、レーン 2 は抗-組織因子 F(ab')₂ LZ 6xHis、宿主株 43H1、レーン 3 は抗-CD18 F(ab')₂ LZ 6xHis、宿主株 49A5、レーン 4 は抗-CD18 F(ab')₂ LZ 6xHis、宿主株 41H1、レーン 5 は pBR322、宿主株 49A5、レーン 6 は抗-VEGF Fab、宿主株 43H1、及びレーン 7 は抗-VEGF Fab、宿主株 43E7 である。HC と H の表示は重鎖を示し、LC と L は軽鎖を示す。

【図 12】図 12 は、異種のポリペプチドとして抗-VEGF Fab(pY0317tet20)を発現する 59A7株(prc-マイナス株)由来の振盪フラスコ細胞沈殿の 2-Dゲルの結果を示す。このゲル中において、prc-プラス細胞中に見出される LC-切断産物及び 2 つの HC 切断断片は消失する。59A7 中で検出される 2 つの分離した HC 切取り断片のみが示され、それらは、OmpT 又は Ptr3 切断産物である。

30

【図 13】図 13 は、異種のポリペプチドとして抗-VEGF Fab(pY0317tet20)を発現する 60C1株(prc-プラス株)由来の振盪フラスコ細胞沈殿の 2-Dゲルの結果を示す。このゲル中において、複数の LC-切断産物及び 2 つの HC 切断断片が検出される。

【図 1 A】

1 GAATTCAACT TCTCCACT TTGGATAAGG AATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA
61 GTTGTATAT AAGCTTTGGA GATTATCCTC ACTGCAATAC TTGCAATAT GCGCAAAAT
121 GACCAACAGC GGTGTATTGA TCAGGTAGAG GGGGCTGTG ACGAGGTAAA GCGGATGCC
181 AGCAATCTCG ACGACGATAC GGAGCTGCTG CCGGATTACG TAAAGAGIT ATTGAAGCAT
241 CCTGCTCAGT AAAAAGTAA TCTTTTCAAC AGCTGTACATA AAGTTGTAC GCGGAGACT
301 TATAGTCCCT TCTTTTAT TTTTAAATGT ATTGTAACT AGAATTGAG CCGGTACCC
341 GGGGATCCTC TAGAGGTGA GTGATTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT
-23 M K K N I A F L

【図 1 B】

414 CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT ATC
-15 L A S M F V F S I A T N A Y A D I
465 CAG TTG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG GTC
2 Q L T Q S P S L S A S V G D R V
516 ACC ATC ACC TGC AGC GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAC TAT TTA AAC TGG TAT
19 T I T C S A S Q G D I S N Y L N W Y
567 CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA GTA CTG ATT TAC TTC ACC TCC TCT
36 Q Q K P G K A P K V L I Y F T S S
618 CTC CAC TCT GGA GTC CTT TCT CCG TTC TCT CGA TCC GGT TCT GGG AGC GAT
53 L H S G V P S R F S G S G S G T D
669 TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAG CCA GAA GAC TTC GCA ACT TAT TAC
70 F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
720 TGT CAA CAG TAT AGC ACC GTG CCG TCG ACG TTT GCA CAG GGT ACC AAG GTG
87 C Q Q Y S T V P W T F G Q G T K V

【図 1 C】

771 GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
104 E I K R T V A A P S V F I F P P S
822 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCT TCT GTT GTG TGC CTG AAT AAC
121 D E Q L K S G T A S V V C L L N N
873 TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA
138 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
924 TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC
155 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T
975 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC
172 Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
1026 AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA
189 K V Y A C E V T H Q G L S P V T
1077 AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA GCTGATC CTCACGCC
206 K S F N R G E C
1131 GACGATGTT GCGCTAGTA CGCAACTAGT COTAAJAGG GTATCTAGAG GTTGAGTGA

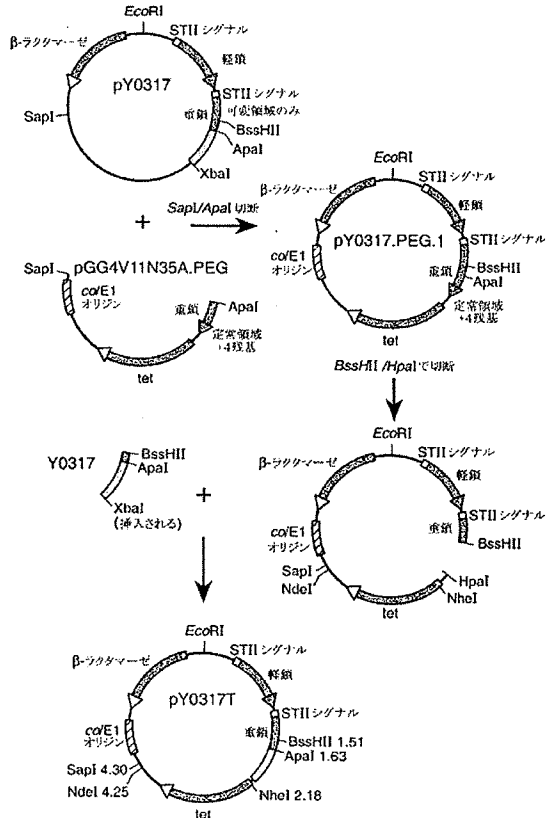
【図 1 D】

1181 TTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT
-23 M K K N I A F L L A S M F V
1227 TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT
-9 F S L A T N A Y A E V Q L V E S
1275 GGC GGT GGC CTG GTG CAG CCA GGG GSC TCA CTC CGT TIG TCC TGT GCA
8 G G G L V Q P G G S C A R L S C A
1323 GCT TCT GCG TAC GAC TTC ACG CAC TAC GGT ATG AAC TGG GTC CGT CAG
24 A S G Y D F T H Y G H N W V R Q
1371 GCG CCG GGT AAG GCG CTG GAA TGG GTT GGA TGG ATT AAC ACC TAT ACC
40 A P C K G L E W V G W I N T Y T
1419 GGT GAA CCG ACT TAT GCT GCG GAT TTC AAA CGT CGT TTC ACT TTT TCT
56 G E F T Y A A D F K R R F T E S
1467 TTA GAC ACC TCC AAA AGC ACA GCA TAC CTG CAG ATG AAC AGC CTG CCG
72 L D T S K S T A Y L Q M N S L R
1515 GCT CAG GAC ACT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AAG TAC CCG TAC TAT TAT
88 A E D T A V Y Y C A K Y P Y Y Y
1563 GGC ACG AGC CAC TGG TAT TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC
104 G T S H W Y F D V W S Q G T L V

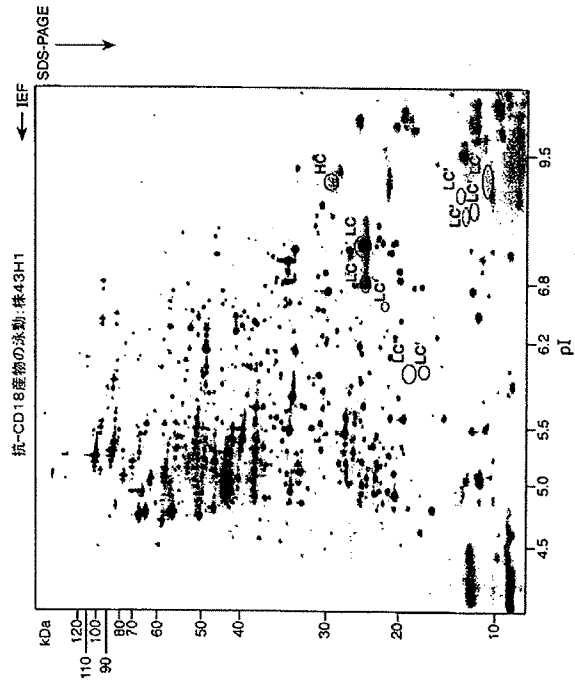
【図 1 E】

1611 ACC CTC TCC TCG GCC TCC ACC AAG GCG CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA
120 T V S S A S T K G P S V F P L A
1659 CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG CCG ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG
116 F S S K S T S G G C T A A L G C C L
1707 GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC
152 V K D Y F F E P V T V S W N S G
1755 GGC CTG ACC AGC GCG GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
168 A L T S G V H T F P A V L O S S
1803 GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC CTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
184 G L Y S L S S V V T V P S S S
1851 GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC
200 G T Q T Y I C H V N H K P S N T
1899 AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC CTC
216 K V D K K V E F K S C D K T H L
1947 TAG AA

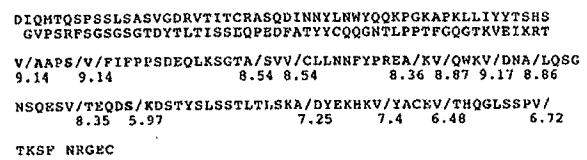
【図 2 A】



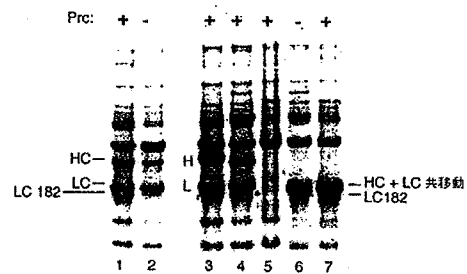
【图 7】



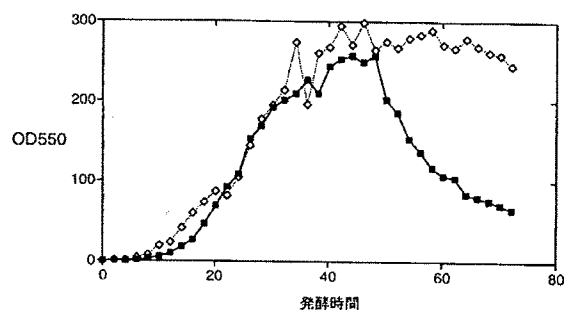
【图 10】



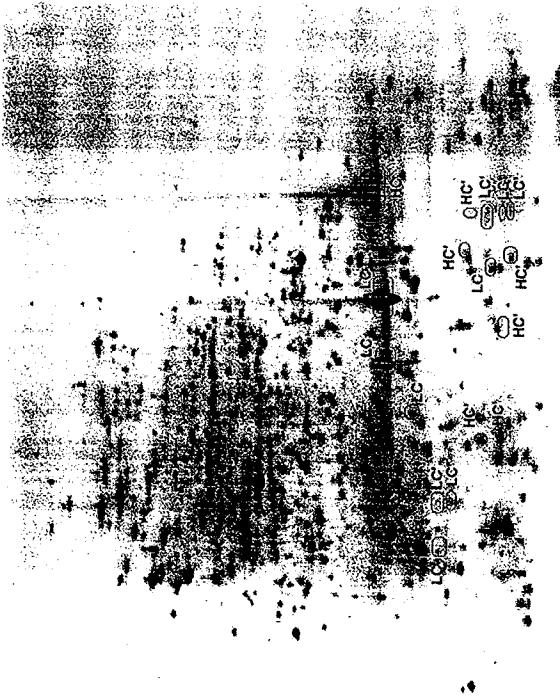
【 図 1 1 】



【图 9】



【図 1 2】



【図 1 3】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

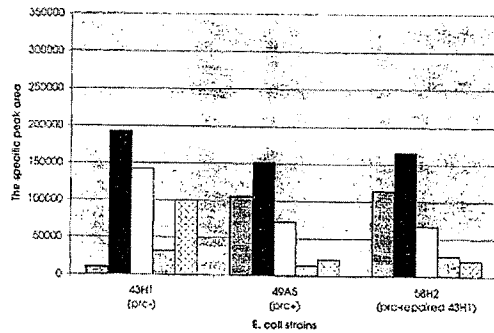
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/48376 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/57, 9/52, 1/20, 1/21, C12P 21/02 # (C12N 1/20, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (21) International Application Number: PCT/US01/47581
- (22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date: 14 December 2000 (14.12.2000) US 60/256,162
- (71) Applicant: GENENTECH, INC., [US/US], 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)
- (72) Inventor: CHEN, Christina Yu-Ching, 940 La Senda Road, Hillsborough, CA 94010 (US)
- (74) Agent: HASAKI, Janet, E. et al., Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)
- (81) Designated States (national): AR, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CH, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: BACTERIAL HOST STRAINS



(57) Abstract: An E. coli strain is described that is deficient in chromosomal *degP* and *pre* encoding protease *DegP* and *Pre*, respectively, and harbors a mutant *spr* gene that encodes a protein that suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *pre* mutants. Preferably, the strain comprises nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain, so that a heterologous polypeptide can be produced therefrom.

WO 02/48376 A2

WO 02/48376 A2



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

BACTERIAL HOST STRAINS

Background of the Invention5 1. Field of the Invention

The invention relates to using proteolytically-deficient bacterial host strains. More particularly, the invention relates to such host strains that eliminate heterologous polypeptide degradation and improve yield of such polypeptides.

2. Description of Related Art

10 *E. coli* strains deficient in proteases or genes controlling the regulation of proteases are known. See, for example, Beckwith and Strauch, WO 88/05821 published August 11, 1988; Chandrury and Smith, *J. Bacteriol.*, 160: 783-791 (1984); Elish *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1355-1364 (1988); Baneyx and Georgiou, "Expression of proteolytically sensitive polypeptides in *Escherichia coli*," In: *Stability of Protein Pharmaceuticals*, Vol. 3: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation, Ahern and Manning, eds. (Plenum Press, New York, 1992), p. 69-108.

15 Some of these strains have been used in attempts to produce efficiently proteolytically sensitive proteins, particularly those of potential medical or commercial importance. U.S. Pat. No. 5,508,192 (to Georgiou *et al.*) describes the construction of many protease-deficient and/or heat-shock protein-deficient bacterial hosts. Such hosts include single-, double-, triple-, or quadruple-protease-deficient bacteria and single-protease bacteria that also carry a mutation in the *rpoH* gene. Examples of the protease-deficient strains disclosed include those omitting *degP*, *ompT*, *ptr3*, and/or *prc* (*txp*), and a *degP* *rpoH* strain reported to produce large titers of recombinant proteins in *E. coli*. Park *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 15: 164-167 (1999) also reported that a strain (HM114) deficient in two cell-envelope proteases (*degP*, *prc*) grew slightly faster and produced more fusion protein than the other strains deficient in more proteases. They claimed that this strain grew to a cell dry weight of 47.86 g/L in 29 hours using pH-stat, fed-batch cultivation. The protein produced was protein A- β -lactamase fusion protein, which gave 30% higher β -lactamase activity than that obtained from its parent strain KS272.

20 The Prc protein was first isolated by Hara *et al.*, *J. Bacteriol.*, 173: 4799-4813 (1991) as the periplasmic protease that cleaves the carboxyl-terminus of periplasmic penicillin binding protein 3 (PBP3). Subsequently, it was also identified as a protease that selectively degrades proteins with a non-polar C-terminus and was re-named Txp (Silber *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 295-299 (1992)). The *prc* gene was shown to encode a 75-kDa protein, which is required for protection of cells from combined thermal and osmotic stress (Hara *et al.*, *supra*). It has been confirmed that the C-terminal sequences determine the substrate preference (Keller *et al.*, *Protein Sci.*, 4: 1507-1515 (1995)). The amount of cleavage is sensitive to the identity of residues or functional groups at the C-

WO 02/48376

PCT/US01/47581

terminus of the substrate protein. The presence of a free β -carboxyl group is important in determining whether closely related peptides with non-polar C-terminal sequences are cleaved efficiently by Pre.

Pre homologs have been identified in a divergent group of prokaryotes, including several cyanobacteria (Brand *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 20: 481-491 (1992); Shostakov *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 19354-19359 (1994)), *Neisseria gonorrhoeae* (Black *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177: 1952-1958 (1995)), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, *Science*, 269: 496-512 (1995)), and *Bartonella bacilliformis* (GenBank accession no.L37094). A domain in the Pre family of proteins is similar to a domain in the retinol-binding proteins, indicating a common folding domain that may form a binding pocket in these proteins for hydrophobic substrates (Silber *et al.*, *supra*; Shostakov *et al.*, *supra*).

Hara *et al.*, *supra*, discovered that the thermoresistant revertants of *Aprc* mutants contain extragenic suppressor (*spr*) mutations. They further identified the wild-type *spr* gene product to be a lipoprotein in the envelope fraction. They suspected that the wild-type *spr* gene could be a peptidoglycan-hydrolyzing enzyme (Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). When the *spr* is not functional in a *pre*-plus background, a suppressor for *spr* mutation was identified to be PBP7, another penicillin-binding protein (Hara *et al.*, 1996, *supra*). The cloning of *spr* and the preparation of a *Aprc* mutant in which *Spr* is not degraded by the protease are also described in Hara *et al.*, Abstract for Table Ronde Roussel Uclaf no. 86, Versailles, May 1997, where the authors concluded that *pre* and *spr* are mutual suppressors.

Three multicopy *pre* suppressors have also been isolated using the conditional lethal phenotype of a *pre* (*sp*) null strain of *E. coli* (Bass *et al.*, *J. Bacteriol.*, 178: 1154-1161 (1996)). None of them relate to the *spr* gene. One set of these suppressors is two putative protease genes in tandem that map to 72.5 min on the chromosome. These two genes are *htrA* homologs, which encode proteins that are 58 and 35% identical, respectively, to the HtrA (DegP) serine protease. Another type of suppressor identified is the *dksA* (*dusk* suppressor) gene, which is also a multicopy suppressor of defects in the heat-shock genes *dnaK*, *dnaJ* and *grpE*. The *dksA* gene was also independently isolated as a multicopy suppressor of a *mutB* mutation, which is required for chromosomal partitioning. The third type is a truncated lipoprotein A (*rlpA*) gene.

The gene *degP* appears to control synthesis of a cell-envelope protease DegP (HtrA). A *degP*-deficient mutant was first constructed and recombined into an *E. coli* chromosome by Beckwith and Strauch, *supra*. HtrA has a high molecular mass of about 500 kDa, which is a heat-shock protein whose proteolytic activity is essential for the survival of *E. coli* at high temperatures such as above 42°C (Skorko-Glonek *et al.*, *Chem.*, 163: 47-52 (1995)). A number of ordinarily unstable cell-envelope proteins can be stabilized by the *degP* mutation (Strauch and Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1676-1680 (1988)). Recently, HtrA protein was reported to behave as a dodecamer consisting of two stacks of hexameric rings by electron microscopy and chemical cross-linking analysis (Kim *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 204: 1363-1374 (1999)). Unfolding of protein substrates, such as by exposure to high temperature or reduction of disulfide bonds, is essential for their access into the inner chamber of the double ring-shaped HtrA, where cleavage of peptide bonds may occur (Kim *et al.*, *supra*).

Many heterologous polypeptides have been produced in various strains deficient in proteases. However, many of the strains gave relatively low product titer and/or poor growth. There is a need to

WO 02/48376

PCT/US01/47581

provide a bacterial strain deficient in proteases that does not result in clipping of the product and provides high product titer.

Summary of the Invention

Accordingly, the present invention is as claimed. In one aspect the present invention provides *E. coli* strains that are deficient in chromosomal *degP* and *pre* encoding protease DegP and Pre, respectively, and harbor or comprise a mutant *spr* gene the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *pre* mutants. Preferably the strain is not deficient in chromosomal *ptrJ* encoding Protease III and/or in chromosomal *ompT* encoding protease OmpT. Preferably, the *E. coli* strain is engineered by introducing the mutant *spr* gene to a *degPA preA* strain for survival in the stationary phase of a high-cell density *E. coli* fermentation process.

In another embodiment, the strain comprises nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain, preferably a proteolytically-sensitive polypeptide, and more preferably a eukaryotic polypeptide.

In a further embodiment, the invention provides a method for producing a heterologous polypeptide, i.e., one that is heterologous to the strain. This method comprises first culturing an *E. coli* strain that is deficient in chromosomal *pre* encoding protease Pre and harbors or comprises a mutant *spr* gene the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *pre* mutants. This strain also comprises nucleic acid encoding the heterologous polypeptide. The culturing is such that the nucleic acid is expressed. In a second step of this method, the polypeptide is recovered from the strain, whether from the cytoplasm, periplasm, or culture medium, preferably the periplasm or culture medium, and most preferably from fermentation whole broth. Preferably, the polypeptide is Apo2 ligand or an antibody, including an antibody fragment.

Brief Description of the Drawings

Figures 1A-1E show the complete nucleotide and encoded amino acid sequences (SEQ ID NOS:1 and 2, respectively) of the expression cassette for preparation of pY0317, a production plasmid for anti-VEGF Fab. Residues in bold denote the CDR residues from the original murine A4.6.1 antibody. Residues in italics and underlined denote murine framework residues that were required for antigen binding.

Figures 2A and 2B show a plasmid diagram for pY0317 (Fig. 2A) as well as plasmid construction of pY0317tet20 (Figs. 2A and 2B).

Figure 3 shows the plasmid diagram for pAPAp02-P2RU.

Figure 4 shows the nucleotide sequence of human Apo-2 ligand cDNA (SEQ ID NO:3) and its derived amino acid sequence (SEQ ID NO:4). The "N" at nucleotide position 447 (in SEQ ID NO:3) is used to indicate the nucleotide base may be a "T" or "G".

Figure 5 depicts a diagram of the derivation of *E. coli* strains 59A7, 49A5, and 43H1.

Figure 6 depicts the 2-D gel result of the fermentation cell pellet derived from strain 49A5 (*pre*-plus strain), expressing the rhuFab'2 anti-CD18-LZ fusion as a heterologous polypeptide. All the LC-related spots are circled.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Figure 7 depicts the 2-D gel result of the fermentation cell pellet derived from strain 43H1 (*prc*-minus strain), expressing the rhuFab'2 LZ (xCD18) antibody fragments. In this gel the LC-cleavage products disappear.

Figure 8 shows the five peaks resolved by an assay using AMESTM Reverse-Phase columns and thereby provides a comparison of the partition of rhuFab'2 LZ (xCD18) antibody fragments thus resolved. The y-axis is the specific peak area of peaks 1 to 5. The x-axis shows the three rhuFab'2 LZ (xCD18) production strains, 43H1 (*prc*-), 49A5 (*prc*+), and 58H2 (*prc*-repaired 43H1). The gray with thick border bar is LC-115; the black bar is LC, the white bar is LC dimer, the gray with thin border bar is Fab-like molecule, and the brick-like pattern bar is Fab'2-LZ. It can be seen that peak 1 (LC-115) disappeared from the *prc*-deletion strain.

Figure 9 shows the growth profiles of standard high-cell density fermentation in *prc*-minus without a mutant *spr* gene (58B3 transformed with pS1130) (squares) and *prc*-minus with a mutant *spr* gene (59A7 transformed with pS1130) (diamonds) strains, expressed as OD550 as a function of fermentation hours.

Figure 10 depicts the humanized anti-CD18 kappa LC sequence (SEQ ID NO:5) with calculated pI values of postulated LC degradation products. The highlighted cleavages with slashes were confirmed by mass spectrometry. See Table 3 below.

Figure 11 depicts a gel with seven lanes using different hosts and three types of proteins. This gel shows that the 20-kD LC clip (LC 182) is not present in 43H1 (*prc*-) cells expressing anti-VEGF Fab and anti-tissue factor Fab'2-LZ fusion molecules. Lane 1 is anti-tissue factor F(ab')2 LZ 6xHis, host strain 33B6, lane 2 is anti-tissue factor F(ab')2 LZ 6xHis, host strain 43H1, lane 3 is anti-CD18 F(ab')2 LZ 6xHis, host strain 49A5, lane 4 is anti-CD18 F(ab')2 LZ 6xHis, host strain 41H1, lane 5 is pBR322, host strain 49A5, lane 6 is anti-VEGF Fab, host strain 43H1, and lane 7 is anti-VEGF Fab, host strain 43E7. The designations HC and H represent heavy chain, and LC and L represent light chain.

Figure 12 depicts the 2-D gel result of the shake flask cell pellet derived from strain 59A7 (*prc*-minus strain) expressing the anti-VEGF Fab (pY0317tet20) as a heterologous polypeptide. In this gel the LC-cleavage products and two HC-cleavage fragments found in *prc*-plus cells disappear. Two separate HC clips detected in 59A7 only were also shown, which are either OmpT- or Pht3-cleaved products.

Figure 13 depicts the 2-D gel result of the shake flask cell pellet derived from strain 60C1 (*prc*-plus strain) expressing the anti-VEGF Fab (pY0317tet20) as a heterologous polypeptide. In this gel, multiple LC-cleavage fragments and two HC-cleavage fragments were detected.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Detailed Description of the Preferred EmbodimentsDefinitions

As used herein, "polypeptide" refers generally to peptides and proteins having more than about ten amino acids. "Heterologous" polypeptides are those polypeptides foreign to the host cell being utilized, such as a human protein produced by *E. coli*. While the polypeptide may be prokaryotic or eukaryotic, preferably it is eukaryotic, more preferably mammalian.

Examples of mammalian polypeptides include molecules such as, e.g., renin, a growth hormone, including human growth hormone; bovine growth hormone; growth hormone releasing factor; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoproteins; 1-antitrypsin; insulin A-chain; insulin B-chain; proinsulin; thrombopoietin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; clotting factors such as factor VIII, factor IX, tissue factor, and von Willebrand factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator, such as urokinase or human urine or tissue-type plasminogen activator (t-PA); bombesin; thrombin; hemopoietic growth factor; tumor necrosis factor-alpha and -beta; antibodies to ErbB2 domain(s) such as 2C4 (WO 01/00245; hybridoma ATCC HB-12697), which binds to a region in the extracellular domain of ErbB2 (e.g., any one or more residues in the region from about residue 22 to about residue 584 of ErbB2, inclusive), enkephalinase; a serum albumin such as human serum albumin; muellerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; protirelin; mouse gonadotropin-associated peptide; a microbial protein, such as beta-lactamase; DNase; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; integrin; protein A or D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5, or -6 (NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor such as NGF; cardiostrophins (cardiac hypertrophy factor) such as cardiostrophin-1 (CT-1); platelet-derived growth factor (PDGF); fibroblast growth factor such as aFGF and bFGF; epidermal growth factor (EGF); transforming growth factor (TGF) such as TGF-alpha and TGF-beta, including TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4, or TGF-5; insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and IGF-II); des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I); insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins such as CD-3, CD-4, CD-8, and CD-19; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein (BMP); an interferon such as interferon-alpha, -beta, and -gamma; serum albumin, such as human serum albumin (HSA) or bovine serum albumin (BSA); colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, and G-CSF; interleukins (ILs), e.g., IL-1 to IL-10; anti-HER-2 antibody; Apo2 ligand; superoxide dismutase; T-cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor; viral antigen such as, for example, a portion of the AIDS envelope; transport proteins; homing receptors; addressins; regulatory proteins; antibodies; and fragments of any of the above-listed polypeptides.

The preferred polypeptides of interest include polypeptides such as HSA, BSA, anti-IgE, anti-CD20, anti-IgG, t-PA, gp120, anti-CD11a, anti-CD18, 2C4, anti-VEGF, VEGF, TGF-beta, activin, inhibin, anti-HER-2, DNase, IGF-I, IGF-II, brain IGF-I, growth hormone, relaxin chains, growth hormone releasing factor, insulin chains or pro-insulin, NGF, NT-3, BDNF, Apo2 ligand, and urokinase. Particularly preferred mammalian polypeptides are antibodies, which include full-length antibodies, antibody fragments, and Apo2 ligand. More preferably, these antibodies are human or

WO 02/48376

PCT/US01/47581

humanized antibodies. These include, e.g., anti-IgE, anti-IgG, anti-Her-2, anti-CD11a, anti-CD18, anti-CD20, and anti-VEGF, 2C4, BSA, or HSA. Still more preferably, the antibody is an anti-CD18, anti-VEGF, anti-tissue factor, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40, or anti-CD11a antibody. Antibody fragments encompassed within the definition of polypeptide include, for example, a Fab, Fab', Fab'2, or Fab'2-leucine zipper (LZ), and most preferably are anti-CD18 Fab'2-LZ, anti-tissue factor Fab'2 LZ-6thix, anti-VEGF Fab, anti-CD8 his-tagged Fab'2 LZ, and anti-CD18 lya-tagged Fab'2LZ.

As used herein, the descriptor "proteolytically sensitive" for polypeptides refers to polypeptides that are prone to be cleaved, susceptible to cleavage, or cleaved by one or more *E. coli* proteases, either in the native state or during secretion.

"High-cell-density" fermentation or culturing refers to a process in which typically first some nutrients are added in batches to allow cell growth and take advantage of the relation between O₂ consumption and glucose consumption to use dissolved oxygen, which is easy to measure, to control glucose addition. To reach higher cell densities, ammonia may be added continuously, and additional minor nutrients (for example, P, K, S, and Mg) may be added at certain stages of the fermentation to support cell growth, as detailed further in the Examples below.

A "mutant *prc* gene, the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *prc* mutants," refers to an *E. coli prc* suppressor (*prp*) (encoding Prp*) with the sequence reported by Hara *et al.*, 1996, *supra*, or one that is mutated, provided that the gene product functions as a suppressor of growth phenotypes of strains with *prc* mutants. Preferably, the mutation consists of one point mutation. Most preferred is the point mutation W148R in which a TGG codon is changed to CGG, which results in a change of tryptophan to arginine at amino acid 148.

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g. bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations that include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1973), or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Claackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include "primatized" antibodies comprising variable-domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (e.g. Old World Monkey, Ape etc) and human constant-region sequences.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s).

An "intact" antibody is one that comprises an antigen-binding variable region as well as a light chain constant domain (C_L) and heavy chain constant domains, C_H1, C_H2 and C_H3. The constant domains may be native sequence constant domains (e.g. human native-sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native-sequence Fc region or Fc region with amino acid sequence variations) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding, complement dependent cytotoxicity, Fc receptor binding, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), phagocytosis, down-regulation of cell-surface receptors (e.g. B cell receptor; BCR), etc.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes". There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcR) (e.g. Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcR1 only, whereas monocytes express FcR1, FcR2 and FcR3. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC

WO 02/48376

PCT/US01/47581

activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes that express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcRIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes that mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells, and neutrophils, with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, e.g. from blood or PBMCs as described herein.

"Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light-chain and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody that are responsible for antigen binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity-determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light-chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy-chain variable domain; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light-chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy-chain variable domain;

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). "Framework Region" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

Pepsin digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and antigen-binding site. This region consists of a dimer of one heavy-chain and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three hypervariable regions of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H - V_L dimer. Collectively, the six hypervariable regions confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three hypervariable regions specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy-chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear at least one free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments that have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

"Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains that enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv, see Plöckthum in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315. Anti-ErbB2 antibody scFv fragments are described in WO93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a variable heavy domain (V_H) connected to a variable light domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H - V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 494,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

"Humanized" forms of non-human (e.g., rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequences derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable

WO 02/48376

PCT/US01/47581

region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody), such as mouse, rat, rabbit, or non-human primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin, and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequencer, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The expression "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a pre-protein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers may be used in accordance with conventional practice.

As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of

WO 02/48376

PCT/US01/47581

transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

5 Modes for Carrying Out the Invention

The present invention provides *E. coli* strains deficient in chromosomal *degP* and *prc* encoding protease DegP and Prc, respectively, and harboring a mutant *spv* gene, the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *prc* mutants. The strain is optionally further deficient in chromosomal *porJ* encoding Protease III and/or in chromosomal *ompT* encoding protease OmpT.

10 In another embodiment, the strain comprises nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain. The strain is preferably transformed with the nucleic acid, which is preferably DNA (cDNA or genomic DNA), as by use of a recombinant expression vector.

In a further aspect, the invention provides a method for producing such heterologous polypeptide. In this method the above *E. coli* strain, which also comprises nucleic acid encoding the polypeptide, is cultured such that the nucleic acid is expressed. Then the polypeptide is recovered from the strain. The recovery may be from the periplasm or culture medium of the strain. Preferably, the culturing takes place in a fermentor, and more preferably under conditions of high cell-density fermentation.

20 Culturing parameters are used and polypeptide production is conducted in a conventional manner, such as those procedures described below.

A. Selection of Nucleic Acid and Modifications Thereof

The nucleic acid encoding the polypeptide of interest is suitably RNA, cDNA, or genomic DNA from any source, provided it encodes the polypeptide(s) of interest. Methods are well known for selecting the appropriate nucleic acid for expression of heterologous polypeptides (including variants thereof) in *E. coli*.

If monoclonal antibodies are being produced, DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transformed into the bacterial host cells herein to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) and Pfleiderer, Immunol. Rev., 130: 151-188 (1992).

35 Methods for humanizing non-human antibodies have been described in the art. Preferably, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), by substituting

WO 02/48376

PCT/US01/47581

hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Pat. No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence that is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available that illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Various forms of the humanized antibody or affinity-matured antibody are contemplated. For example, the humanized antibody or affinity-matured antibody may be an antibody fragment, such as a Fab, that is optionally conjugated with one or more targeting agent(s) in order to generate an immunconjugate. Alternatively, the humanized antibody or affinity-matured antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody.

Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, BioTechnology, 10: 163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single-chain Fv fragment (scFv) (WO 93/16183; U.S. Pat. Nos. 5,371,894

WO 02/48376

PCT/US01/47581

and 5,587,458). The antibody fragment may also be a "linear antibody", e.g., as described in U.S. Pat. No. 5,641,870. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the Dkk-1 protein. Bispecific antibodies can be prepared as full-length antibodies or antibody fragments (e.g., F(ab')₂ bispecific antibodies).

According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant-domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable bacterial host organism. This provides for great flexibility in adjusting the molar proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

According to another approach described in U.S. Pat. No. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers that are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g., tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g., alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/200373, and EP 030689).

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Pat. No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to dithionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Additionally, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies (Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)).

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers (Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992)). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins are linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers are reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "disbody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (scFv) dimers has also been reported (Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 60 (1991)).

Nucleic acid molecules encoding polypeptide variants are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, or cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the polypeptide.

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, e.g., so as to enhance Fc receptor binding. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions into an Fc region of the antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in U.S. Pat. 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

Other modifications of the antibody are contemplated herein. For example, the antibody may be linked to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol.

B. Insertion of Nucleic Acid Into a Replicable Vector

The heterologous nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) is suitably inserted into a replicable vector for expression in the bacterium under the control of a suitable promoter. Many vectors are available for this purpose, and selection of the appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acid to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components depending on the particular host cell with which it is compatible. Depending on the particular type of host, the vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, a promoter, and a transcription termination sequence.

In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences that are derived from species compatible with the host cell are used in connection with *E. coli* hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences that are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species (see, e.g., Bolivar *et al.*, *Gene*, 2: 95 (1977)). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. The pBR322 plasmid, or other bacterial plasmid or phage, also generally contains, or is modified to contain, promoters that can be used by the *E. coli* host for expression of the selectable marker genes.

(i) Signal Sequence Component

The DNA encoding the polypeptide of interest herein may be expressed not only directly, but also as a fusion with another polypeptide, preferably a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the polypeptide DNA that is inserted into the vector. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed (*i.e.*, cleaved by a signal peptidase) by the host cell.

For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native or a eukaryotic polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group consisting of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

(ii) Origin of Replication Component

Expression vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria such as *E. coli*.

(iii) Selection Gene Component

Expression vectors generally contain a selection gene, also termed a selectable marker. This gene encodes a protein necessary for the survival or growth of transformed host cells grown in a selective culture medium. Host cells not transformed with the vector containing the selection gene will not survive in the culture medium. This selectable marker is separate from the genetic markers as utilized and defined by this invention. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies other than those caused by the presence of the genetic marker(s), or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. In this case, those cells that are successfully transformed with the nucleic acid of interest produce a polypeptide conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin (Southern *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327 (1982)), mycophenolic acid (Mulligan *et al.*, *Science*, 209: 1422 (1980)) or hygromycin (Sugden *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 5: 410-413 (1985)). The three examples given above employ bacterial genes under eukaryotic control to convey resistance to the appropriate drug G418 or neomycin (geneticin), xgt (mycophenolic acid), or hygromycin, respectively.

(iv) Promoter Component

The expression vector for producing the polypeptide of interest contains a suitable promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the nucleic acid encoding the polypeptide of interest. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems (Chang *et al.*, *Nature*, 273: 615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281: 544 (1979)), the arabinose promoter system (Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 174: 7716-7728 (1992)), alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980) and EP 36,776) and hybrid promoters such as the *lac* promoter (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)). However, other known bacterial promoters are suitable. Their nucleotide sequences have been published, thereby enabling a skilled worker operably to ligate them to DNA encoding the polypeptide of interest (Sieberlist *et al.*, *Cell*, 20: 269 (1980)) using linkers or adaptors to supply any required restriction sites.

Promoters for use in bacterial systems also generally contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the polypeptide of interest. The promoter can be removed from the bacterial source DNA by restriction enzyme digestion and inserted into the vector containing the desired DNA.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

(v) Construction and Analysis of Vectors

Construction of suitable vectors containing one or more of the above-listed components employs standard ligation techniques. Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and re-ligated in the form desired to generate the plasmids required.

- 5 For analysis to confirm correct sequences in plasmids constructed, the ligation mixtures are used to transform *E. coli* K12 strain 294 (ATCC 31,446) or other strains, and successful transformants are selected by ampicillin or tetracycline resistance where appropriate. Plasmids from the transformants are prepared, analyzed by restriction endonuclease digestion, and/or sequenced by the method of Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467 (1977) or Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981), or by the method of Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980).

C. Selection and Transformation of Host Cells

- 15 *E. coli* hosts suitable as parental hosts for expression plasmids herein include *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, and *E. coli* X1776 (ATCC 31,537). These examples are illustrative rather than limiting. Mutant cells of any of the above-mentioned strains may also be employed as the starting hosts that are then further mutated to contain at least the minimum genotype required herein. *E. coli* strain W3110 is a preferred parental host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Examples of starting *E. coli* hosts to be used as parent hosts, along with their genotypes, are included in the table below:

Strain	Genotype
W3110	K-12 F ⁻ lambda ⁻ D(rmD-rmE)1
1A2	W3110 <i>Δ</i> phnA
9E4	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3
27A7	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>phoA</i> ΔE15 <i>Δ</i> (argF-lac)169
27C6	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>phoA</i> ΔE15 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>ΔompT</i>
27C7	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>phoA</i> ΔE15 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>ΔompT</i> <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r)
33D3	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>lacIq</i> <i>lacL8</i> <i>ΔompT</i> <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r)
36F8	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>phoA</i> ΔE15 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>ptr</i> 3 <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r) <i>thyG2096</i> ^r
43D3	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>phoA</i> ΔE15 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>ΔompT</i> <i>degP</i> 41 (<i>ΔPst1-kan</i> ^r) <i>thyG2096</i> ^r
43E7	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>ΔompT</i> <i>ptr</i> 3 <i>phoA</i> ΔE15 <i>degP</i> 41 (<i>ΔPst1-kan</i> ^r) <i>thyG2096</i> ^r
44D6	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r) <i>ΔompT</i> <i>thyG2096</i> ^r
45F8	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r) <i>ΔompT</i> <i>phoS</i> ⁺ (T107) <i>thyG2096</i> ^r
45F9	W3110 <i>Δ</i> phnA <i>ptr</i> 3 <i>Δ</i> (argF-lac)169 <i>degP</i> 41 (<i>Δpsl1-kan</i> ^r) <i>ΔompT</i> <i>thyG2096</i> ^r <i>phoS</i> ⁺ (T107) <i>Δcyo::kan</i> ^r

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Also suitable are the intermediates in making strain 36F8, i.e., 27B4 (U.S. Pat. No. 5,304,472) and 35E7 (a spontaneous temperature-resistant colony isolate growing better than 27B4). An additional suitable strain is the *E. coli* strain having the mutant periplasmic protease(s) disclosed in U.S. Pat. No. 4,946,783 issued August 7, 1990.

5 The strains of this invention may be produced by chromosomal integration of the parental strain or other techniques, including those set forth in the Examples below.

The nucleic acid encoding the polypeptide is inserted into the host cells. Preferably, this is accomplished by transforming the host cells with the above-described expression vectors and culturing in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing the various promoters.

10 Transformation means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in section 1.82 of Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), is generally used for prokaryotic cells or other cells that contain substantial cell-wall barriers. Another method for transformation employs polyethylene glycol/DMSO, as described in Chung and Miller, Nucleic Acids Res., 16: 3580 (1988). Yet another method is the use of the technique termed electroporation.

D. Culturing the Host Cells

15 Prokaryotic cells used to produce the polypeptide of interest are cultured in suitable media as described generally in Sambrook *et al.*, *supra*. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

Where the alkaline phosphatase promoter is employed, *E. coli* cells used to produce the polypeptide of interest of this invention are cultured in suitable media in which the alkaline phosphatase promoter can be partially or completely induced as described generally, e.g., in Sambrook *et al.*, *supra*. The culturing need never take place in the absence of inorganic phosphate or at phosphate starvation levels. At first, the medium contains inorganic phosphate in an amount above the level of induction of protein synthesis and sufficient for the growth of the bacterium. As the cells grow and utilize phosphate, they decrease the level of phosphate in the medium, thereby causing induction of synthesis of the polypeptide.

20 Any other necessary media ingredients besides carbon, nitrogen, and inorganic phosphate sources may also be included at appropriate concentrations introduced alone or as a mixture with another ingredient or medium such as a complex nitrogen source. The pH of the medium may be any pH from about 5-9, depending mainly on the host organism.

35 If the promoter is an inducible promoter, for induction to occur, typically the cells are cultured until a certain optical density is achieved, e.g., a A_{550} of about 200 using a high cell density process, at which point induction is initiated (e.g., by addition of an inducer, by depletion of a medium component, etc.), to induce expression of the gene encoding the polypeptide of interest.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

E. Detecting Expression

Gene expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences of the polypeptide. Various labels may be employed, most commonly radioisotopes, particularly ³²P. However, other techniques may also be employed, such as using biotin-modified nucleotides for introduction into a polynucleotide. The biotin then serves as the site for binding to avidin or antibodies, which may be labeled with a wide variety of labels, such as radionuclides, fluorescers, enzymes, or the like. Alternatively, assays or gels may be employed for detection of protein.

For secretion of an expressed gene product, the host cell is cultured under conditions sufficient for secretion of the gene product. Such conditions include, e.g., temperature, nutrient, and cell density conditions that permit secretion by the cell. Moreover, such conditions are those under which the cell can perform basic cellular functions of transcription, translation, and passage of proteins from one cellular compartment to another, as are known to those skilled in the art.

F. Purification of Polypeptides

The following procedures, individually or in combination, are exemplary of suitable purification procedures, with the specific method(s) used being dependent on the type of polypeptide: fractionation on immunoaffinity or ion-exchange columns; ethanol precipitation; reversed-phase HPLC; hydrophobic-interaction chromatography; chromatography on silica; chromatography on an ion-exchange resin such as S-SEPHAROSETM and DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium-sulfate precipitation; and gel filtration using, for example, SEPHADEXTM G-75.

The monoclonal antibodies may be suitably separated from the culture medium by conventional antibody purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The invention will be more fully understood by reference to the following examples. They should not, however, be construed as limiting the scope of the invention. All literature and patent citations herein are incorporated by reference.

EXAMPLE 1

Material and Methods

A. Expression Plasmids1. Plasmids for expressing rhoFab'2 LZ (xCD18) and tagged derivativespS1130

Plasmid pS1130 is a pBR322-based plasmid described in U.S. Pat. Nos. 6,180,367 and 6,258,560. The rhoFab'2 LZ (xCD18) synthesis is regulated by the *E. coli* alkaline phosphatase (AP) promoter. When the AP promoter is induced by phosphate depletion, it forms a di-cistronic messenger RNA in the order of STII signal-kappa light-chain coding sequence; STU signal-heavy-chain coding

WO 02/48376

PCT/US01/47581

sequence, followed by a leucine zipper sequence. A lambda transcription terminator was placed near the translation termination codon.

pxc34

Plasmid pxc34 is a tacII promoter counterpart of pS1130.

5

pxCD18-7T3

The dual-promoter plasmid containing two separate translational units, pxCD18-7T3, allows for the temporal separation of transcription of light chain from the transcription of heavy chain. As in pS1130, the light chain remains under the control of the *phoA* promoter. However, in pxCD18-7T3, a λ transcriptional terminator follows the light-chain coding sequence. Downstream of this terminator, the tacII promoter was added to control the transcription of the heavy chain fragment/C-terminal leucine zipper (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)). A second λ transcriptional terminator follows this coding sequence. Silent codon variants of the STII signal sequence were used to direct the secretion of both chains (Simacas and Yencura, *Nature Biotechnology*, 14: 629-634 (1996)). Specifically, the nucleotides in the STII signal sequence were modified such that the light chain had a TIR relative strength of 7 and the heavy chain had a TIR relative strength of 3, and the last three nucleotides of the signal sequence preceding both the light and heavy chains were GCT. In this two-promoter system the *phoA* promoter sequence and the DNA for the light and heavy antibody chains are the same as in pS1130.

20

pAB3

Plasmid pAB3 is designed to express an anti-CD18 F(ab')₂ in the *E. coli* periplasm under the control of the alkaline phosphatase promoter (Kikuchi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9 (21): 5671-5678 (1981)) and has a leucine zipper and is His-tagged. The heat-stable enterotoxin II signal sequence (Picken *et al.*, *Infect. Immun.*, 42: 269-275 (1983)) precedes the light and heavy chains, and onto the C-terminal end of the heavy chain is fused the yeast GCN4 leucine zipper followed by six histidine residues. The light- and heavy-chain coding sequences are in a polycistronic configuration with the λ transcriptional terminator (Scholtissek and Grosse, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3185 (1987)) following the heavy-chain gene.

30

The plasmid pAB3 was constructed by ligating together three DNA fragments, the first of which was the vector pS1130 in which the small *KpnI-SphI* fragment had been removed. The second part in the ligation was an approximately 645 base-pair *KpnI-HindIII* fragment from pS1130. The final part in the ligation was a synthetic DNA duplex with the following sequence:

5' - AGCTTGTCGGGAGCCCATCACCATCACCATCACTAAGCATG (SEQ ID NO: 6)

35

ACAGCCCTCGCGGTAGTGGTAGTGGTAGTGAATTC - 3' (SEQ ID NO: 7)

pAB21

Plasmid pAB21 is a derivative of pAB3 in which the six histidine residues on the

WO 02/48376

PCT/US01/47581

C-terminal end of the heavy chain have been replaced with six lysine residues. This plasmid was constructed in an identical manner as pAB3 except that the synthetic DNA used in the ligation was the following:

5'-AGCTTGTCTGGGGAGCGGCAAAAAGAAAAGTATGCAATG (SEQ ID NO: 8)

5 ACAGCCCCGCGGTTTTTCTTTCTTTTCATTC-5' (SEQ ID NO: 9)

2. Plasmid for expressing anti-IF Fab'2 L₂-6xhis

Plasmid D3H44-F(ab')₂ (also known as pD3H44I2), constructed to direct production of anti-tissue factor Fab'2 leucine zipper - 6xhis, has exactly the same backbone DNA sequence as pAB3 except that the variable regions for HC and LC were changed from xCD18 VL/VH to xTF VL/VH. The construction of this plasmid is described in WO 01/70984 published 27 September 2001.

Specifically, first, the plasmid for expressing anti-IF Fab (D3H44-F(ab)) was prepared as follows: The plasmid pEMX1 used for mutagenesis and expression of F(ab)s in *E. coli* has been described in Werther *et al.*, *J. Immunol.*, 157: 4986-4995 (1996). Briefly, the plasmid contains a DNA fragment encoding a consensus human κ subgroup I light chain (VL κ -CL), a consensus human subgroup III heavy chain (VHIII-CH1) and an alkaline phosphatase promoter. The use of the consensus sequences for VL and VH has been described in Carter *et al.*, *BioTechnology*, 10:163-167 (1992); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992).

Site-directed mutagenesis (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492 (1985)) was performed on a deoxyuridine-containing template of pEMX1. The six CDRs were changed to the murine D3 sequence; the residues included in each CDR were from the sequence-based CDR definitions (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, Ed. 5, Public Health Service (National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)), except for CDR-H1, which was defined using a combination of CDR-H1 definitions from Kabat *et al.*, *supra*, and Chothia *et al.*, *Nature*, 342: 877-833 (1989), i.e., CDR-H1 was defined as extending from residues H26-H35 in the heavy chain. D3H44-F(ab) therefore encoded a F(ab) consisting of a complete human framework (VL κ subgroup I and VH subgroup III) with the six complete murine CDR sequences.

D3H44-F(ab')₂ was generated by the addition of the heavy-chain hinge (CPPCPAPELLGG; SEQ ID NO:10) to the C-terminus of the D3H44-F(ab), followed by the GCN4 leucine zipper and a (his)₆ tag for purification (see the description for pAB3 above for the leucine zipper and his₆ tag).

3. Plasmids for expressing anti-VEGF Fab

pY0317

The affinity-matured anti-VEGF Fab protein Y0317 is described in Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 293: 865-881 (1999). For constructing a plasmid to produce it, pY0317, briefly, an expression cassette was cloned into the framework of the *E. coli* plasmid pBR322 at the *EcoRI* site (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43: 77-90 (1978)). The expression cassette contained at least the following basic components: (1) *phoA* promoter for the control of transcription; (2) λ terminators to end transcription; and (3) the Shine-Dalgarno sequence from the *E. coli* *trp* or the heat stable enterotoxin II (STII) gene, or a combination of both, to facilitate translation. The basic components of bacterial

WO 02/48376

PCT/US01/47581

expression cassettes are known in the art and have been described in, for example, Kikuchi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8(21): 5671-5678 (1981) (for *phoA* promoter); Schollitschek and Grosse, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3183 (1987) (for *lac* terminator); Yanofsky *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9: 6647-6668 (1981) (for *trp*); Picken *et al.*, *Infect. Immun.*, 42: 269-275 (1983) (for STII); and Chang *et al.*, *Gene*, 55: 189-196 (1987) (for combination use of *trp* and STII Shine-Dalgarno sequence). Additionally, the STII signal sequence or silent codon variants thereof preceded the coding sequence for both light and heavy chains in pY0317 for producing anti-VEGF Fab and directed the secretion of the protein into the periplasm. Picken *et al.*, *Infect. Immun.*, 42: 269-275 (1983); Simmons and Yamaura, *Nature Biotechnology*, 14: 629-634 (1996). The nucleotide and amino acid sequences for the 1952-base-pair expression cassette inserted into the *EcoRI* site for recombinant protein production are shown in Figure 1 (SEQ ID NOS: 1 and 2, respectively).

RhuFab V2 Y0317 was created by humanization of the murine A.4.6.1 (Presta *et al.*, *Cancer Res.*, 57: 4593-4599 (1997) monoclonal antibody using a process previously described for other antibodies (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623-2632 (1993); Werther *et al.*, *J. Immunol.*, 157: 4986-4995 (1996)). Briefly, cDNAs encoding the muMAb A.4.6.1 variable light and variable heavy chains were isolated using RT-PCR from hybridoma cells producing the murine monoclonal antibody. These cDNAs were cloned and fused to human CL and human CH1 domains (Werther *et al.*, *J. Immunol.*, 157: 4986-4995 (1996)), generating a mouse-human chimeric Fab. The six complement-determining regions (CDRs) (denoted in Figure 1 in bold type) were transplanted into a previously humanized antibody vector encoding a consensus human κ subgroup I light chain and a consensus human subgroup III heavy chain (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992)). Transferring just the CDR residues into the human framework caused a 1000-fold reduction in binding to the VEGF antigen. Several framework residues near the CDRs (denoted in Figure 1 in italicized and underlined type) also were changed to improve binding to the target (Presta *et al.*, *Cancer Res.*, 57: 4593-4599 (1997)). In all, seven heavy-chain residues and one light-chain residue were changed outside of the CDRs. The heavy and light chains were then moved into a phage-display vector (Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272: 10678-10684 (1997)), replacing the hGH gene of pGfham-g3 (Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990)). Site-directed mutagenesis was used to change VL Met4Leu to preclude methionine oxidation and VH Thr231Leu for ease of cloning to the geneIII fusion. This vector is termed Y0101 and was used as the starting point for optimization of the CDRs in binding to the VEGF antigen (Muller *et al.*, *Structure*, 6: 1153-1167 (1998)). Only mutations in CDRs H1 and H3 were found to improve binding and were incorporated into the final version pY0317. The changes from the pY0101 plasmid to the pY0317 plasmid are: Thr28Asp, Asn311His, His101Tyr, Ser105Thr. All these changes are in the variable heavy-chain region. The pY0317 plasmid is a Fab phage display vector. A plasmid diagram of this plasmid appears in Figure 2A.

pY0317tet20

Plasmid pY0317tet20 was constructed to direct production of the rhuFab V-2 in *E. coli*. Figures 2A and 2B show a flow chart of the plasmid construction, which starts with pY0317. The

WO 02/48376

PCT/US01/47581

plasmid pY0317tet20 is a modified version of the well-characterized pBR322 plasmid. The 639-base-pair *AvaI*-*PvuII* fragment has been removed from the pBR322 portion of the plasmid. This deletion removes the *rop* gene, which is involved in copy number control (Cesareni *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**: 6313-6317 (1982)). Consequently the plasmid has a slightly elevated copy number compared to pBR322. A 1952-base-pair expression cassette (Figure 1) has been inserted into the *EcoRI* site for recombinant protein production. Plasmid pY0317tet20 is resistant to both tetracycline and β -lactam antibiotics. The expression cassette contains a single copy of the light chain and heavy chain linked in tandem. Transcription of each gene into a single dicistronic mRNA is directed by the *E. coli* *phoA* promoter (Chang *et al.*, *Gene*, **44**: 121-125 (1986)). Translation-initiation signals for each chain are provided by *E. coli* STII (heat-stable enterotoxin) Shine-Dalgarno sequences. Translation of each chain begins with a 23-residue STII signal peptide (Picken *et al.*, *Infection and Immunity*, **43**: 269-275 (1983)) that directs translocation of the peptides across the cytoplasmic membrane into the periplasmic space. The STII signal peptide is then removed by the *E. coli* leader peptidase. The light and heavy chains fold into their native conformations after secretion into the periplasm and are covalently joined by an intermolecular disulfide bond.

Tetracycline resistance was placed on the final vector through modifications of pY0317 (see Figures 2A and 2B). A 3642-base-pair *SapI*/*ApaI* fragment of pY0317, which includes the origin of replication of pBR322, the β -lactamase gene, the *phoA* promoter, the entire light chain, and the amino-terminal half of the heavy chain (VH), was ligated to a 2738-base-pair *SapI*/*ApaI* fragment of p6G4V11N35A.PEG. This second fragment contains the CH1 region of the heavy chain and the tetracycline-resistance gene from pBR322. This fragment also contains four extra amino acids at the carboxyl terminus of the heavy chain for site-specific modification of the protein. The region containing the four extra residues and the CH1 region were removed with a *Bst*XII/*HpaI* digest and replaced with the *Bst*XII/*XbaI* fragment of pY0317, restoring the original heavy-chain sequence and deleting the site-specific modification region. The *XbaI* digest was performed first and the overhang filled in with Klenow and dideoxynucleotides. This was followed by the *Bst*XII digest and gel purification of the 433-base-pair fragment. A final manipulation of the plasmid was performed replacing the *NdeI*-to-*NdeI* fragment of pBR322 with a *NdeI*/*NdeI* fragment of pBR322 containing a 639-base-pair *AvaI*-*PvuII* deletion. The final plasmid, pY0317tet20, is resistant to tetracycline and β -lactam antibiotics, and contains the *phoA* promoter and the genes encoding the light and heavy chains of anti-VEGF.

4. Plasmid for Expressing Apo2L

pAPApo2-P2RU is described in WO 01/00832 published January 4, 2001. Briefly, this plasmid, the construct of which is shown in Figure 3, encodes the co-expression of Apo-2L (amino acid residues 114-281) and the tRNA's encoded by *pro2* and *argU*, which co-expression is regulated by the alkaline phosphatase promoter. The pBR322-based plasmid (Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**:77-90 (1978)) pAPApo2-P2RU was used to produce the Apo-2L in *E. coli*. The transcriptional and translational sequences required for the expression of Apo-2L are provided by the alkaline phosphatase promoter and the *np* Shine-Dalgarno, as described for the plasmid pHGH1 (Chang *et al.*, *Gene*, **55**:189-196 (1987)). The coding sequence for Apo-2L (from 114-281) is located

WO 02/48376

PCT/US01/47581

downstream of the promoter and Shine-Dalgarno sequences and is preceded by an initiation methionine. The coding sequence includes nucleotides (shown in Figure 4) encoding residues 114-281 of Apo-2L (Figure 4 (SEQ ID NOS:3 and 4, respectively, for nucleotide and amino acid sequences)) except that the codon encoding residue Pro119 is changed to "CCG" instead of "CCT" in order to eliminate potential secondary structure. The sequence encoding the lambda λ transcriptional terminator (Scholtissok *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3185 (1987)) follows the Apo-2L coding sequence.

Additionally, this plasmid also includes sequences for the expression of the tRNA's *pro2* (Kosine *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 212:579-598 (1990)) and *argU/dnaY* (Garcia *et al.*, *Cell*, 45:453-459 (1986)). These genes were cloned by PCR from *E. coli* W3110 and placed downstream of the lambda λ transcriptional-terminator sequence. This plasmid confers both tetracycline and ampicillin resistance upon the production host.

B. Cell Transformations

Competent cells of the relevant strain were prepared and transformed with the appropriate plasmid using standard procedures, and successful transformants were selected and grown in culture. For plasmids that were resistant to tetracycline, the transformants were picked from LB plates containing 20 μ g/mL tetracycline (LB+Tet20), streak-purified, and grown in LB broth with 20 μ g/mL tetracycline in a 30°C shaker/incubator before being stored in DMSO at -80°C.

In the case of the plasmids pxC18-7T3 and pcy34, an additional plasmid, pMS421, was co-transformed along with pxC18-7T3 or pcy34. pMS421 is a pSC101-based plasmid that overexpresses *lacIq* suppressor, which suppresses the induction of the *lacII* promoter until IPTG was added to de-suppress it, and which also confers spectinomycin and streptomycin resistance. This plasmid provides additional copies of the *lacIq* chromosomal gene under the control of its own promoter from a *lacIq* strain, which gene is put into the compatible plasmid pSC101.

C. Antibody Extraction

The soluble fraction of *E. coli* cells was prepared by suspending a 20 OD-mL pellet in 500 μ L of 200 mM TRIS-HCl (pH 8.0) with 20 μ L of 0.1 M EDTA (pH 8.0) and 10 μ L of lysozyme (6 mg/mL). This mixture was vortexed, sonicated for 7-10 pulses, then centrifuged at 15,000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatant fraction after centrifugation is called the high-salt extract (HSE). The remaining pellet was used for insoluble fraction analysis.

D. Protein Identification

The one-dimensional SDS-PAGE gel electrophoresis was carried out in a 4-12% linear acrylamide gradient from Novex. Specifically, the system used was the NOVEX® NuPage™ System, consisting of NuPAGE Bis-TRIS Pre-Cast Gels (for low- to mid-molecular weight proteins).

The two-dimensional gel electrophoresis was carried out as described by Champion *et al.*, *Electrophoresis*, 20 (4-5): 994-1000 (1999)), with immobilized pH gradients (pH 3-10) in the first dimension and a linear acrylamide gradient (9-18%) in the second dimension, purchased from

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Amersham Pharmacia Biotech. Protein identification was determined using a combination of silver/Coomassie staining, N-terminal sequencing, and mass spectrometric analysis. For analytical gels, *E. coli* cell lysates (~40 µg protein) were combined with rehydration solution as described by Champion *et al.*, *supra*. Eighteen-cm pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient (IPG) gel strips (Amersham Pharmacia Biotech) were used for isoelectric focusing for a total of 50,000 Vh.

Preparatively loaded gels were blotted to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (ProBlott; Applied Biosystems) as described by the manufacturer. The N-terminal sequencing was done using a 20-min Edman cycle and a multiple sample horizontal flow reactor for the sequence analysis of PVDF-electroblotted proteins (Henzel *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 267:148-160 (1999)).

The molecular weight of light-chain-specific spots was estimated from MALDI-TOF mass spectrometry and capillary LC-MS of samples eluted from gels (Champion *et al.*, *supra*).

E. Measurement of the Target Protein Species

The AMESTM reverse-phase dual-column assay (AMESTM/RP dual-column assay) was used for anti-CD18 F(ab')₂ L₁ titer determination, as described below.

F. AMESTM/RP dual-column Assay

1. Instrumentation and Equipment

An INTEGRALTM workstation (from PerSeptive Biosystems) was set up in the dual-column gradient configuration. An affinity column containing an anti-light-chain (kappa) Fab antibody (AMESTM) immobilized on controlled-pore glass (CPG) was used to capture the target protein. A reversed-phase column, temperature controlled at 60°C, was used to further resolve the captured antibody species. Activated aldehyde immunoaffinity resin (AL-20), reversed-phase POROS resins (R220), and column-packing devices were obtained from PerSeptive Biosystems, (Cambridge, MA, USA). CPG Empty PEEK columns, 30 x 2.1 mm (100 µl), were purchased from Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA). *E. coli* samples were filtered using ACRODISCTM PF syringe 5-micron filters (from Gelman Sciences).

2. Purification of AMESTM anti-human kappa Fab (his-gly), his-(lys)

Phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) containing 9.4 mM sodium phosphate, 136.9 mM sodium chloride, and 2.7 mM potassium chloride is referred to herein as loading buffer. Monoclonal antibodies were obtained from a murine Fab, AMESTM anti-human kappa Fab (his-gly), his-(lys), which was purified from *E. coli* paste and is called AMESTM Fab hlg for purposes herein. The *E. coli* paste was obtained from a 10-liter fermentation in 27C7 cells. A microfluidizer was used to homogenize the cells after resuspension in 20 mM sodium phosphate, 0.25 M sodium chloride, 10 mM magnesium chloride, and 2 mM imidazole at pH 7.0. The *E. coli* extract was clarified by addition of 0.2% polyethyleneimine (PEI) and centrifugation. The clarified extract was purified using a combination of ion exchange and immobilized metal-ion-chelating (IMAC) chromatography steps. Chelating SEPHAROSE FAST FLOWTM and SP SEPHAROSE FAST FLOWTM resins were from Amersham Pharmacia.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

3. Immobilization of AMESTM Fab Igk to activated glyceryl-coated CPG

The purified Fab was immobilized onto periodate-activated glyceryl-coated controlled pore glass (CPG) to make the affinity resin. AMESTM Fab Igk antibody was immobilized onto activated glyceryl-coated CPG using a modification of the method of Roy *et al.*, *J. Chromatography*, 303: 225-228 (1984).

Dry CPG was wetted with purified water, packed into a chromatography column, and activated for 30 minutes by recirculating 1% sodium metaperiodate (Sigma S-1878TM) through the column. The activated resin was then washed into 20 mM sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2 (coupling buffer).

AMESTM Fab Igk antibody at a concentration of approximately 5 mg/mL in coupling buffer containing 1 µg/mL of the reducing agent sodium cyanoborohydride (Sigma S8628) was recirculated through the activated resin bed. The coupling of the antibody to the resin was monitored by the decrease in absorption at 280 nm. When there was no further decrease in absorption, any remaining antibody was washed out with coupling buffer and recovered. The coupling density was determined by the difference between the starting amount and the amount recovered after the reaction was completed and is reported in mg Fab per mL of resin.

Any remaining active sites on the resin were then reacted by recirculating 1 M ethanolamine, pH 8.0 (ICN, catalog # 151078) in the presence of 1 µg/mL sodium cyanoborohydride for 2 hours. The resin was then washed into coupling buffer containing 0.01% thimerosal (GDL International) for storage. The resin was precycled three times between equilibration and elution buffers to be used before any protein was applied.

4. Reagents and Assay Method

The solvent reservoirs were: Solvent 1A, affinity loading buffer; Solvent 1B, reversed-phase aqueous buffer and affinity elution buffer, 0.1% TFA in water; Solvent 2A, water. Solvent 2B, reversed-phase organic elution buffer, 0.09% TFA/80% acetonitrile. Fifty µL of *E. coli* HSEs (diluted 1:2) or the supernatant of the fermentation broth in loading buffer was injected. All forms of anti-CD18 found in fermentation cell extracts were captured by this AMESTM antibody as determined by comparison of 2-D-gels of a blank run, a production run, and affinity-captured (AMESTM) material from a production run. After non-specific adsorption had been reduced (by washing with PBS), the affinity column was placed in-line with a reversed-phase column and the captured components were transferred by elution with dilute acid. These components were subsequently resolved by eluting the reversed phase column with a shallow acetonitrile gradient. Detection was performed by measurement of absorbance at 280 nm, and intact antibody was quantified by comparison with peak areas of similarly treated standards.

35

G. Peak Identification of Chromatogram

This assay resolved anti-CD18 fragments into five antibody-related peaks, which represent the following antibody fragments:

Peak 1: LC-115 (115 amino acids degradation product of kappa light chain)

40 Peak 2: unassembled free light chain and glutathionated-light chain

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Peak 3: the light-chain dimer

Peak 4: the Fab-like fragment

Peak 5: the Fab'2-LZ or Fab'2 fragment

A purified bulk anti-CD18 F(ab)'2 release material (5 mg/mL) was used as the standard. An *E. coli* extract derived from a high-cell-density fermentation of 49A5/pS1130 was frozen at -70°C and used as the positive control. Equal cell mass was loaded for all the samples compared.

H. Total HPLC POROS™ Reversed-Phase Assay

To assess the total quantity of light-chain and heavy-chain fragments produced in the fermentations, an alternative reversed-phase HPLC assay (RP-HPLC) was used. For total antibody expression 100 µL of whole broth was added with 100 µL of 0.2 M TRIS 8.0. After sonication for 10 pulses, 650 µL of guanidine-HCl / 50 mM TRIS, pH 9 and 50 µL of 2M DTT were added and incubated at room temperature for 15 minutes. Before loading to the column, 200 µL of acetonitrile was added and filtered through a size-exclusion spin column (Pharmacia). Five µL of this suspension was analyzed by the POROS™ reversed-phase assay.

For the reversed-phase methodology, a HEWLETT-PACKARD™ 1100 HPLC was used with a Perceptive POROS™ R-1 reversed phase column. Analyses were run with the column heated to 60°C, and UV absorbance at 278 nm was monitored. The column was equilibrated in a 28% acetonitrile solution in water with 0.1% trifluoroacetic acid. Twenty-five µL of sample was next loaded on the column, and elution was performed using a linear gradient from 28% to 38% acetonitrile over 20 minutes, followed by a 17-minute period of regeneration at 95% acetonitrile and re-equilibration at 28% acetonitrile. Peaks for light-chain- and heavy-chain-related species were identified by comparison with standards and analysis using a HEWLETT-PACKARD™ mass selection detector for confirmation. Fermentation samples from a blank run in which the same host was used except with a plasmid not containing the sequences for heavy and light chain, were similarly prepared and analyzed to determine the appropriate baselines for the analyses. Integration of the peak areas was performed using the HEWLETT-PACKARD™ 1100 software, and standards were spiked into blank run samples to generate a calibration curve in order to determine the relative quantity of the various species in the samples.

For the soluble samples lysates were prepared as for the ion-exchange assay. Typically, 100 µL of sample was diluted with 650 µL of 6M guanidine-HCl, 50 mM TRIS-HCl, pH 9. Fifty µL of 2M dithiothreitol (freshly thawed) was then added, followed by 200 µL of acetonitrile, followed by filtration with a 0.2 µm filter prior to loading on the HPLC.

The insoluble lysate samples were also similarly analyzed by resuspending the PBS-washed, insoluble pellets obtained after cell extraction in 100 µL of 0.2 M TRIS 8.0 and mixing well. Then 650 µL of 6M guanidine-HCl / 50 mM TRIS-HCl, pH 9, 50 µL of 2M DTT, and 200 µL of acetonitrile were added. The samples were then filtered, and 10 µL of the filtered samples was analyzed using the same method as for the soluble lysate samples.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

I. CSX Assay

Digestion of the anti-CD18 Fab'2 LZ was analyzed by HPLC cation-exchange chromatography. Specifically, samples were diluted at least 1:1 and 250 μ l are loaded onto a BAKERBONDTM carboxy-sulfen (CXX) 50 x 4.6-mm column (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) maintained at 55°C on a Hewlett-Packard 1090 HPLC system. Samples were eluted using a gradient of approximately 5 to 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) over 14 minutes, and peaks were monitored using UV absorbance at 278 nm. The peak containing anti-CD18 Fab'2-leucine zipper was identified and quantified by comparison with purified standards.

J. Cell Line Constructions

The hosts used in the rhaFab'2 LZ (xCD18) fermentation are derivatives of *E. coli* W3110 (Buchmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219), and are designated as follows: 49A5, 58B3, 59A7, 43H1, 58H2, 45F8, 41H1, and 33D3. Figure 5 depicts a diagram of the derivation of *E. coli* strains 59A7, 49A5, and 43H1.

1. Strain 49A5

The complete genotype of 49A5 is *AshuA phoA AE15A(argP-lac)169 deoC2 degP41(hpsI-Kar)* *IN(rrD-rE)1 hvg2096 (Val') ΔlacP ΔmalE*. The starting strain, *E. coli* W3110, is a derivative of *E. coli* K-12 that is F⁻ and lambda-minus. It has been shown to carry an inversion of the chromosome between *rnaD* and *rnaG* (Buchmann, *supra*; Hill and Harnish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7069-7072 (1981)). The *fluA* gene (previously designated *toxA*) was deleted from W3110 by imprecise excision of *Tn10* following its insertion into the *fluA* gene. The resulting strain, 1A2, is resistant to bacteriophage T1, T5 and ø80.

The two deletion mutations, *phoA ΔE15* (Sarthly A. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 145: 288-292 (1981)) and *Δ(arg-lac)169* (Schweizer *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 192: 293-294 (1983)), were simultaneously introduced into strain 1A2 by P1 co-transduction with a linked *Tn5* insertion in the *proC* gene. Precise excision of the transposon restored the *proC* gene. The *phoA ΔE15* mutation eliminates alkaline phosphatase expression, and the *Δ(argP-lac)169* mutation is responsible for the *lac*⁻ phenotype of this strain, which is designated 7C1.

The *deoC2* mutation, which eliminated deoxyribose phosphate aldolase expression, was introduced by P1 co-transduction. The *deoC* locus is genetically linked to the threonine biosynthetic locus. A threonine auxotroph was created by *Tn10* insertion and imprecise excision. The threonine auxotroph was then transduced to threonine prototrophy with P1 phage, grown on a *deoC2* mutant. The presence of the *deoC2* mutation was confirmed by the inability of the resulting strain, 16C9, to grow on 0.2% thymidine as a carbon source.

The *degP41(hpsI-Kar)* mutation, a mutation in the gene for a periplasmic protease, was introduced by transduction. This mutation was constructed *in vitro* by replacing a section of the *degP* gene with a kanamycin-resistance gene (Strauch and Beckwith, *J. Bacteriol.*, 171: 2689-2696 (1989)). This is not a transposon, but allows for selection of the deletion using kanamycin resistance. The resulting strain is designated 23F3.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

The *thyG2096 (Val)* mutation (Lawther *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 922-925 (1981)) was introduced by homogenization. This mutation repairs a frameshift that causes the wild-type *E. coli* K-12 to be sensitive to valine. Strain 23E3 was transformed with plasmid pAB29 (Lawther *et al.*, *supra*) containing the *thyG2096 (Val)* marker and an ampicillin-resistance gene. A strain designated 33B6, which had spontaneously lost the plasmid and which had acquired the desired allele, was identified by screening ampicillin-sensitive clones for valine resistance.

Finally, two mutations in the carbohydrate-utilization pathway were introduced to allow this host to be distinguished from other recombinant hosts by a simple carbohydrate utilization test. Deletion mutations of *fucP* and *malE* were constructed by PCR and were separately incorporated into a plasmid vector containing beta-lactamase and levan sucrase (Bass *et al.*, *supra*). Each entire plasmid was recombined into the chromosome of a W3110 derivative that would not support independent replication of the plasmid vector (Bass *et al.*, *supra*). Strain 33B6 was then transduced to carbenicillin resistance with P1 phage grown on the W3110 derivative carrying the *fucP* deletion plasmid integrated into its chromosome. Derivatives no longer expressing levan sucrase and therefore sucrose resistant were selected and screened for loss of carbenicillin resistance and inability to use fucose. The resulting strain, 49B2, was confirmed to carry the planned *fucP* deletion using PCR.

These steps were repeated to incorporate the *malE* deletion. Strain 49B2 was transduced to carbenicillin resistance using P1 phage, and grown on the strain carrying the *malE* deletion plasmid integrated into its chromosome. Then sucrose-resistant derivatives were selected and screened for loss of carbenicillin resistance and inability to use maltose, and the presence of the *malE* deletion was confirmed by PCR.

The important characteristics of the strain 49A5 include the following:

- It is resistant to T1 phage.
- It does not overproduce alkaline phosphatase, when phosphate is depleted (which is the condition used to induce product synthesis).
- It lacks a protease.
- It is not susceptible to valine toxicity.
- It can be distinguished from other hosts by a carbohydrate-utilization test.

2. Strain 58B3

The strain 58B3 was also derived from the 33B6 strain. The $\Delta prc::pS1080$ genotype (Bass *et al.*, *supra*; Metcalf *et al.*, *Gene*, 138: 1-720 (1994)) was introduced into a *kan^r* derivative of strain 33B6 (56G4) by P1 transduction, selecting for colonies not growing well on half-strength LB with low salt at 42°C. The *kan^r* strain carries the *degP* deletion derived from pKS16 (Strauch and Beckwith, 1989, *supra*), resulting in a kanamycin-sensitive phenotype. Therefore, 58B3 strain is a *kan^r* strain carrying both *degP* and *prc* deletion.

The complete genotype of 58B3 strain is W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta phaAE15$ $\Delta (argF-lac)169$ *deoC* *degP41* *DN(rD-rrE)1* *kan^r* *thyG2096(Val)* Δprc .

WO 02/48376

PCT/US01/47581

3. Strain 59A7

This strain is constructed by introducing the *Prc* suppressor (*Spr* mutant) into the 58B3 strain. The P1 phage lysate of the 51B9 strain (*tonA prc prc zap722::Tn10*) was transduced into the 58B3 strain selecting for tet-resistant colonies and screening for the *Prc* suppressor phenotype (growing well on half-strength LB with low salt at 42°C). The new strain is called 58F1. The *Δprc* mutant cannot survive at 42°C. The tetracycline-resistance gene was removed from 58F1 by plating on Malcoy plates, which resulted in a *tet*^s-sensitive strain, designated 59A7. The complete genotype of the 59A7 strain is W3110 *ΔhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41 IN(rrD-rrE)1 Kan^r livG2096(Val^r) Δprc sprW148R*.

The original 51B9 strain has a *Prc* suppressor *Spr*, which carried a point mutation W148R, the same as *Spr* in the 43H1 and 59A7 strains.

4. Strain 43H1

The complete genotype of the 43H1 strain is very similar to that of 49A5: W3110 *ΔhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41(Δpat1-Kan^r) IN(rrD-rrE)1 livG2096(Val^r) pr3 ΔompT prc::kan^r sprW148R*. It carries three more protease markers than 49A5, *Per3*, *OmpT* and *Prc*. This strain has the point mutation (W148R) in the *Spr*. It is *Kan^r*.

5. Strain 58H2

The 43H1 strain was transduced to *tet^s* with P1 phage grown on strain 42E3. This strain (58F9) was repaired for the *prc::kan^r* mutation; therefore, it became *kan^r*. This strain was then plated on minimal glucuronic acid medium to remove the *eda::Tn10*. The new strain created, 58H2, is *kan^r* and became a triple-protease mutant with wild-type *prc*. The complete genotype of the 58H2 strain is W3110 *ΔhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41(Δpat1-Kan^r) IN(rrD-rrE)1 livG2096(Val^r) pr3 ΔompT sprW148R*.

6. Strain 45F8

The complete genotype of the 45F8 strain is W3110 *ΔhuA Δ(argF-lac)169 degP41 Kan^r ΔompT pr3 livG2096(Val^r) phoS*(T104)*. This is a *phoS* strain with triple-protease markers.

7. Strain 41H1

The complete genotype of the 41H1 strain is W3110 *ΔhuA phoS*(T104) Δ(argF-lac)169 degP41 (Δpat1-Kan^r) pr3 livG2096(Val^r) T-adapted at 37°C*. This is a *phoS* strain with dual-protease markers.

8. Strain 33D3

The complete genotype of the 33D3 strain is W3110 *ΔhuA pr3 lacIq lacL8 ΔompT degP41 (Δpat1-Kan^r)*. A description of the construction can be found, e.g., in U.S. Pat. No. 5,789,199.

K. Shake Flask and Fermentation Cultures

For the shake-flask experiment, Luria-Bertani (LB) broth and C.R.A.P. minimal medium were used with 5 μg/mL of AMPICILINTM antibiotic. The C.R.A.P. minimal medium was prepared as follows: 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g NaCitrate-2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g yeast extract, and 5.36 g HYCLEASE SP-SHERFIELDTM were mixed, the pH was adjusted with KOH to 7.3, and the volume was

WO 02/48376

PCT/US01/47581

adjusted to 872 mL with deionized water. This mixture was then autoclaved and cooled to 55 °C. 110 mL 1 M MOPS buffer at pH 7.3, 11 mL 50 % glucose, and 7.0 mL 1 M $MgSO_4$ were added.

The *E. coli* fermentation process employed herein was a high-cell-density process as defined above. To reach higher cell densities, ammonia was added continuously, and additional minor nutrients (P, K, S, and Mg) were added at certain stages of the fermentation to support cell growth. Lowering the amount of nutrients resulted in another process having lower final optical density of the broth with equal quality of product, which is referred to herein as the low-cell-density process.

A single vial containing 1.5 mL of culture in 10-15% DMSO was thawed into a 1-L shake flask containing 500 mL of LB medium supplemented with 0.5 mL of tetracycline solution (5 mg/mL) and 2.5 mL 1M sodium phosphate solution. This seed culture was grown for approximately 16 hours at 30°C and was then used to inoculate a 10-liter fermentor.

The fermentor initially started with approximately 6.5 L medium containing about 4.4 g glucose, 100 mL 1M magnesium sulfate, 10 mL of a trace element solution (100 mL hydrochloric acid, 27 g ferric chloride hexahydrate, 8 g zinc sulfate heptahydrate, 7 g cobalt chloride hexahydrate, 7 g sodium molybdate dihydrate, 8 g cupric sulfate pentahydrate, 2 g boric acid, and 5 g manganese sulfate monohydrate, in a final volume of 1 liter), 20 mL of a tetracycline solution (5 mg/mL in ethanol), 10 mL of FERMAX ADJUVANT 27™ (or some equivalent anti-foam), 1 bag of HCD salts (37.5 g ammonium sulfate, 19.5 g potassium phosphate dibasic, 9.75 g sodium phosphate monobasic dihydrate, 7.5 g sodium citrate dihydrate, and 11.3 g potassium phosphate monobasic), and 200 g NZ Amine A (a protein hydrolysate). Fermentations were performed at 30°C with 10 slpm of air flow and were controlled at a pH of 7.0 ± 0.2 (although occasional excursions beyond this range occurred in some cases). The back pressure of the fermentor and agitation rate were varied to manipulate the oxygen transfer rate in the fermentor, and, consequently, to control the cellular respiration rate.

Following inoculation of the fermentor with the cell-containing medium from the shake flask, the culture was grown in the fermentor to high cell densities using a computer-based algorithm to feed a concentrated glucose solution to the fermentor. Ammonium hydroxide (58% solution) and sulfuric acid (24% solution) were also fed to the fermentor as needed to control pH. Further additions of anti-foam were also used in some cases to control foaming. When the culture reached a cell density of approximately 40 OD550, an additional 100 mL of 1M magnesium sulfate was added to the fermentor. Additionally, a concentrated salt feed (consisting of approximately 10 g ammonium sulfate, 26 g dibasic potassium phosphate, 13 g monobasic sodium phosphate dihydrate, 2 g sodium citrate dihydrate and 15 g monobasic potassium phosphate in 1 L of water) to the fermentor was started at a rate of 2.5 mL/min when the culture reached approximately 20 OD550 and continued until approximately 1250 mL were added to the fermentation. Fermentations were typically continued for 72-80 hours.

During the fermentation, once the dissolved oxygen setpoint for the fermentation was reached, the concentrated glucose solution was fed based on the dissolved oxygen probe signal to control the dissolved oxygen concentration at the setpoint. Consequently, in this control scheme, manipulations of fermentor operating parameters such as the agitation rate or back pressure, which affect the oxygen transfer capacity in the fermentation, correspondingly manipulated the oxygen uptake rate or metabolic rate of the cells.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

A mass spectrometer was used to monitor the composition of the off-gas from the fermentation and enabled the calculation of the oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates in the fermentation.

When the culture reached a cell density of approximately 220 OD550, the agitation was decreased from an initial rate of 1000 rpm to approximately 725 rpm over approximately 12 hours.

For fermentation of cells transformed with pMS421 and poyc34 (where the *lacII* promoter was used to control both heavy- and light-chain expression), or of cells transformed with pMS421 and the dual-promoter plasmid pxC18-7T3 (where the *lacII* promoter was used to control heavy-chain expression), 50 mL of 200 mM IPTG was added approximately 12 hours after the culture reached a cell density of 220 OD550 to induce heavy- and light-chain synthesis for poyc34 and heavy-chain synthesis for pxC18-7T3.

Results

15 A. The Kappa Light Chain Cleavage Products Discovered and Identified

Soluble *E. coli* extracts (see HSE in Materials & Methods) and the remaining pellets, suspended in SDS sample buffer (a commonly available commercial product for running a SDS gel) were analyzed by SDS-PAGE. The samples were derived from the 20 OD-mL pellets collected during the *E. coli* high-cell-density (HCD) fermentation in the 49A5 strain carrying the pS1130 plasmid for rhIF(ab)2LZ (xC18) production. In the soluble fraction the kappa LC cleavage fragment, 115 amino acids in length, was identified. In the insoluble fraction the kappa LC cleavage fragment, 182 amino acids in length, was identified. All the fragments were transferred to a PVDF membrane and sequenced. Both of them had the correct N-terminus as the processed forms of kappa-LC. The masses were determined by mass spectrometric analysis to be 12488.5 and 19857.2 Da, respectively. The sites of proteolytic cleavage were between residues Val 115 and Phe 116 for LC-115 and between residues Ser182 and Lys183 for LC-182. Only one site looked like a typical *Pro* clipping site.

Another *E. coli* 20 OD-mL pellet at the end of this fermentation was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *E. coli* cell lysate of the pellet (~40 µg protein) was combined with rehydration solution as described by Champion *et al.*, *supra*. On the 2-D gel pattern of cells derived from the 49A5 / pS1130 fermentation, the kappa-light-chain-specific spots were identified by comparing the production gel with a blank 2-D gel derived from cell pellets of a (49A5/ pBR322) fermentation at a similar time point. The pellets were chosen from the same time point of two fermentations, assuming the cells should be in comparable metabolic states. All the kappa LC spots were identified by immunoblot using alkaline phosphatase-conjugated anti-human kappa LC antibody.

Besides the two major clips identified by 1-D gel analysis, the 2-D gel showed intact LC, an iso-form of intact LC, and at least 3 more minor LC-clips (see Figure 6). The corresponding spots were eluted and sequenced. All the LC-specific peptides had the correct N-terminus, indicating that they are all well processed with the STII signal being cleaved. All of these peptides were analyzed by mass spectrometer to measure the approximate mass. Due to the trace amount of the minor clips present, a correct mass could not be obtained to determine the clipping sites of those fragments.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Three minor clips clustered with the Kappa LC-115 clip at pI value around 9. The fourth one had a pI value around 6.5 and the fifth one had the same pI value as the LC-182 clip at pI around 6. To decide the solubility of these LC fragments, a HSE of an identical pellet was loaded on a 2-D gel. The LC182 fragment only existed in the insoluble fraction.

5 B. Pre is the Sole Protease Responsible for the Cleavage of Kappa-Light Chain

1-D SDS-PAGE gels loaded with the insoluble fraction of cells derived from four different fermentations of *E. coli* protease mutants, 49A5, 45F8, 41H1, and 43H1, expressing anti-CD18 Fab'2 LZ molecule were compared. The LC-182 proteolytic cleavage was present in three of the four samples (not in the *pre*-deletion strain 43H1), indicating that the *Pre* protease might be involved in kappa-LC cleavage. Peak 1, which corresponds to the LC-115 clip, present in samples derived from strain 49A5 (*pre*-plus), also disappeared from the 43H1-derived samples when comparing chromatograms resolved by the AMESTM/RP dual-column assay. This assay selectively adsorbed kappa-LC-containing antibody species and then resolved them into five peaks as described above in the Material and Methods section.

15 When the 2-D gel of 43H1-derived cell pellets was analyzed, it was found that not only LC-115 and LC-182 fragments disappeared from the gel, but also all the other LC-related minor species disappeared (see Figure 7). This result strongly suggests that *Pre* is the only enzyme responsible for kappa-LC cleavages. This 43H1 cell pellet was derived from a low-cell-density fermentation.

20 C. Strain Construction to Confirm that Pre is the Only Enzyme Involved in Kappa-Light-Chain Cleavage

1. A *pre*-deletion Strain to Become *pre*-plus

Proof that *Pre* is the only enzyme involved in kappa-LC cleavage was obtained by repairing the 43H1 strain (a *pre*-minus host with quadruple protease markers) to become a *pre*-plus, triple-protease strain (58H2). A strain 42E3 carries *eda::Th10*, which is cotransducible with *pre*. The 43H1 strain was transduced to *tet*^r with P1 phage grown on 42E3. The resulting strain (58F9) was repaired for the *pre::kan*^r mutation; therefore, it became *kan*^r. This strain was then plated on minimal glucuronic acid medium to remove the *eda::Th10*. The new strain created, 58H2, became a triple-protease mutant with wild-type *pre*. This isolate is either a transductant or spontaneous *Eda*⁺ isolate. The *pre*-plus genotype was confirmed by PCR. This 58H2 strain still carries the *pre* suppressor (*apr*^{sup}) derived from 43H1, and it is *kan*^r. The re-appearance of LC-clips in this 58H2 strain was detected by the AMESTM/RP dual-column assay (see Figure 8).

2. The *pre* Gene was Deleted from a Native Strain to Become *pre*-minus

The strain 49A5 was a *pre* wild-type strain, as described above. When the *pre* deletion was introduced into this strain background to construct the 58B3 strain and the cell extracts were assayed by the AMESTM/RP dual-column method, the LC-115 clip (peak 1) disappeared. The strain 58B3 was derived from the 33B6 strain, which carries only a protease marker, DegP. The *Δpre::pST080* (Bass *et al.*, *supra*; Metcalf *et al.*, *supra*) was introduced into a *kan*^r derivative of 33B6 (56C4) by P1 transduction to create a *degP Δpre* dual-protease strain, 59A7.

A summary of the cleavage results for all seven strains is shown in Table 1.

40

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Table 1: *E. coli* Host Strains Expressing anti-CD18 F(ab)'2 Leucine Zipper

<i>E. coli</i> host	Protease marker	LC degradation
49A5	DegP	+
45E8	DegP Prr3	+
41H1	DegP Prr3 OmpT	+
43H1	DegP Prr3 OmpT ΔPrr3 ^{W1552}	-
58H2	DegP Prr3 OmpT Spr ^{W1552}	+
58B3	DegP ΔPrr3	-
59A7	DegP ΔPrr3 Spr ^{W1552}	-

D. Yield Improvement of rhuFab'2 LZ (αCD18) in *prc*-Minus Hosts

1. Shake Flask Results

5 Three strains (49A5, 43H1, and 58H2) expressing rhuFab'2 LZ (αCD18) were first grown in LB broth +Amp overnight at 30°C. Then all the cultures were equally inoculated into shake flasks containing 25 mL of the C.R.A.P. minimal medium +Amp and continued to shake overnight at 30°C. Twenty OD-mL pellets were collected to make the soluble lysates (HSE). Twenty-five μl out of 530 μl was loaded into the AMESTM/Reverse-Phase columns.

10 Figure 8 shows the bar graph representing the five peaks resolved by this assay. The Y-axis is the specific peak area of peak 1 to 5 (see Materials & Methods). The X-axis shows the rhuFab'2 LZ (αCD18) production strains. Both *prc*⁺ strains, 49A5 and 58H2, produced almost equal amounts of product, and both of them showed almost equal amounts of LC-115 fragment (peak 1), compared to almost nothing in peak 1 and more peak 5 product in the Δ*prc* strain (43H1). This graph showed the partition of antibody fragments. Higher amounts of soluble, intact LC and LC dimer were observed in the 43H1 host than in the 49A5 and 58H2 hosts. In shake flasks the *prc*⁺ host produced almost 5-fold more of the rhuFab'2 LZ (αCD18) product than did the native *prc* strains.

2. Fermentation Results

20 The average rhuFab'2 LZ (αCD18) titer obtained by the standard high-cell-density (HCD) fermentation was 893 mg/L in the wild-type *prc* host (49A5, n=6), based on the AMESTM/RP dual-column assay. A close to two-fold titer improvement was observed from the 43H1/pS1130 fermentation. The dramatic difference between the shake flask (5x) and fermentation (< or equal to 2x) titers for the 43H1 and 49A5 hosts, respectively, was, without being limited to any one theory, probably due to the difference in secretion efficiency of products. When the total lysates of shake flask
25 pellets were analyzed, only 50% of the antibody fragments were correctly processed in the *prc*-plus background, while the lysate derived from 43H1 shake flask cells or all the fermentation-derived cells (*prc*-plus and minus) showed 100% processing. The processing of Prr protein was found to be *secY*, *secE* dependent (Hara *et al.*, 1991, *supra*). Without being limited to any one theory, it is believed that the shake flask result shows that the Prr protein competed with the antibody fragments for translocation.
30

WO 02/48376

PCT/US01/47581

3. Total Expression of Antibody Fragments was Measured

A POROSTM column assay of whole broth fermentation samples was developed as described in the Materials & Methods section, to assess the efficiency of antibody folding and assembly. When equal injections of whole broth samples derived from three anti-CD18 HCD fermentations were compared in different hosts, it was found that the 43H1 fermentation expressed a similar amount of HC as the 49A5 fermentation, but a higher amount of intact kappa-LC (see Table 2). The rhuFab'2 LZ (xCD18) titer was 1830 mg/L for 43H1 compared to 887.8 mg/L for 49A5. The 59A7 fermentation not only produced extra antibody fragments, it also resulted in the highest titer of rhuFab'2 LZ (xCD18) at 2403 mg/L.

Table 2: The Total Expression of Antibody Fragments and the Fab'2-LZ Titers of Different Strains Expressing rhuFab'2LZ (xCD18) by Standard HCD Fermentation Process

Fermentation Samples	Host	Total LC (g/L)	Total HC (g/L)	Total MC+LC (g/L)	Fab'2-LZ (mg/L)	Time (hr)
1	49A5	2.23	2.27	4.5		40
2	"	4.75	3.96	8.71	887.8	72
3	43H1	6.57	4	10.57		62
4	"	7.38	4.18	11.56	1830	72
5	59A7	12.49	6.87	19.36		68
6	"	13.76	7.46	21.22	2403	72

E. Pre-Suppressor is Required for Stationary Phase Survival

It was found that the 58B3 strain, carrying the *degP* and *pre* deletions, exhibited lysis during the prolonged stationary phase growth of a HCD fermentation expressing anti-CD18 Fab'2 LZ molecule. The cell lysis started at 50 hrs after inoculation. It produced only 320 mg/L of rhuFab'2LZ (xCD18), while the 59A7/pS1130 fermentation maintained good growth at stationary phase until 72 hrs of a HCD fermentation to reach high cell density (about 300 OD₄₉₀-mL). Figure 9 shows the growth comparison of these two fermentations. Also found was extra high expression of both the HC and LC fragments in this strain background, which increased the yield of the rhuFab'2 LZ (xCD18) molecule to 2403 mg/L. Again no kappa-LC clips were found in samples derived from both 58B3 and 59A7 *pre*-deletion strains.

The *pre* suppressor (*spr*) (encoding Ptc^{sup}) was originally isolated herein from strain 40A6 (*pre::kan spr*), as a spontaneous mutation, i.e., a thermoresistant revertant of the *pre* deletion mutant. After the gene was sequenced and conjugation mapped, it was found to be located at approximately 48

WO 02/48376

PCT/US01/47581

min on the *E. coli* chromosome. The nucleotide sequence of its PCR product matched that of the *E. coli* *spr* gene reported by Hara *et al.*, 1996, *supra*, except for one point mutation at amino acid 148, in which a TGG codon was changed to CGG, which resulted in a change of a tryptophan residue into arginine (W148R). This *pre* suppressor when introduced into the 59A7 strain had the W148R mutation.

- 5 The wild-type *spr* gene was reported to encode a lipoprotein in the envelope fraction, which is suspected to be a peptidoglycan-hydrolyzing enzyme (Hara *et al.*, 1996, *supra*).

- The *Pre* suppressor was introduced into the 59A7 strain by a *Tn10* linked to this suppressor, and co-transductants were selected for that are both tetracycline resistant and capable of growing on a half-strength LB low-salt plate at 42°C. The new point mutation occurred at the time when *Tn10* was removed by Malloy plates.

- Based on the anti-CD18 Fab'2 fermentation results of 58B3 versus 59A7 strains, the *Pre* suppressor was shown to be required for successful growth of a *ΔPre* mutant, especially in a high-cell-density *E. coli* fermentation. The strain, designated as 58B3, carries exactly the same genotype as 59A7 except for *spr* (W148R), and could not stay viable in a standard HCD fermentation after 50 hours.

- 15 **F. The *Pre* Deletion Mutant can Increase Various Antibody Production Levels due to the Location of the *Pre* Clipping Sites**

Figure 10 shows the humanized kappa LC sequence (SEQ ID NO:5). The calculated pI values of potential *Pre* clips are shown in Table 3.

- 20

Table 3: Calculated pI Values of Potential *Pre* Clips

calculated pI value	cleavage site	protease type	LC-clips
5.97	S/K	Serine specific	LC-182
9.14	V/F	<i>Pre</i>	LC-115
9.14	S/V	Serine specific	LC-114
9.14	V/A	<i>Pre</i>	LC-110

- Without being limited to any one theory, based on Figure 10 and Table 3 it is believed that the *Pre* protease started to clip the kappa-LC from its C-terminus, 9 or 18 amino acids into the LC sequence, and then gradually chewed it toward the N-terminus to open up the S/K site for a serine-specific protease to work. It was possible that another kappa LC species (possibly in a different folding state) got cleaved mainly up to 115 amino acids. Many potential cleavage products have molecular weights and calculated pI values that are matched quite well with the kappa LC spots found from the 2-D gel.

- 30 Figure 11 shows that the *pre*-deletion strain (43H1) eliminated the LC-182 clip from cells expressing anti-VEGF Fab, anti-CD18 Fab'2 LZ, anti-CD18 Fab'2-LZ-6xHis molecules and anti-tissue factor Fab'2-LZ-6xHis molecules. The fermentation samples derived from cab2826 (33B6/D3H44-F(ab')2) and cab2847 (43H1/D3H44-F(ab')2) were high-cell density fermentations intended to express the anti-tissue factor Fab'2 LZ-6xHis molecule. The fermentation process was the same standard HCD

WO 02/48376

PCT/US01/47581

process as described above for anti-CD18 Fab'2 LZ fermentations. Cab2793 was the 49A5/pAB3 fermentation intended to express the anti-CD18 Fab'2 LZ-6xHis molecule. Cab 2846 was the 41H1/pS1130 fermentation intended to express anti-CD18 Fab'2 LZ molecule. J181 (43H1/pY0317) and J167 (43E7/pY0317) fermentations were intended for making anti-VEGF Fab. Cab 2814 was
 5 (49A5/pBR322), blank fermentation, which contains the similar plasmid backbone without antibody-expressing genes.

The 20-OD fermentation pellets were extracted with TRIS/EDTA/lysozyme to remove the soluble HSEs. The remaining pellets were suspended in 400 µL of 1x SDS sample buffer plus 20 µL of beta-mercaptoethanol, and then were heated at 94°C on a heat block for 5 minutes. Then 5 µL was
 10 loaded into the 4-12% NUPAGE™ gel. The 33B6, 41H1, 49A5, and 43E7 strains are *pre-plus* strains. The 43H1 strain was a *pre-minus* strain. All the native *pre*-strain-derived samples have the 19.8-kD LC degraded product. The cab2829 (33B6/pD3H44TD) fermentation sample, which expressed anti-IF Fab, could also detect the same size LC-degradation fragment. All of these fragments were amino acid sequenced and found to have their correct N-terminal LC sequences.

15

G. Strain 59A7 Shows Superior Expression in Shake Flasks for anti-CD18 His- and Lys-Tagged Fab'2 LZ and Apo2L Cytoplasmic Protein

Additional shake flask data shown in Table 4 indicate that the strain 59A7 expressed pAB3 (the anti-CD18 His-tagged Fab'2 LZ) better than did the strain 43H1 and 49A5. The strain 59A7
 20 expressed pAB21 (Lys-tagged Fab'2 LZ) better than did the 33B6 strain by 2.4 fold. The strains 59A7 and 43H1 expressed pS1130 (Fab'2 LZ without tag) better than the 49A5 strain by 2.9 fold. However, fermentation results always showed that strain 59A7 is better than strain 43H1 in pS1130 expression.

For the non-antibody cytoplasmic protein Apo2L, the specific activity is about 20-30% higher when expressed in strain 59A7 than in strain 43E7 (in shake flasks). Since strain 43E7 grew to a
 25 higher OD550, the total expression was similar. The 43E7 strain is an *ompT ptr-3 degP* strain without *pre* and *apr*.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Table 4: The Higher Specific Titers of Various Proteins Expressed in 59A7 and Other Strains in Shake Flask Cultures

Strain	Protease marker(s)	pSI130 mg/L/OD- mL	pAB3 mg/L/OD- mL	PAB21 Mg/L/OD- mL	Apo2L mg/L/OD-mL
33B6	DegP	N.A.	N.A.	0.33	N.A.
49A5	DegP	0.38	0.46	N.A.	N.A.
43H1	DegP ⁺ Prr3 ⁺ OmpT ⁺ Pre Spr ^{wt128}	1.1	0.5	N.A.	N.A.
59A7	DegP Spr ^{wt128}	1.1	0.7	0.8	14.4 15.2
43E7	DegP Prr3 ⁺ OmpT ⁺	N.A.	N.A.	N.A.	12.2 11.4

5 H. Strain 59A7 Shows Superior Expression by Fermentation for anti-CD18 Fab'2 LZ

Table 5 indicates that strain 59A7 was superior to 33D3 in expressing anti-CD18 Fab'2 LZ from the dual-promoter plasmid pxC18-7T3 and superior to 49A5 in expressing anti-CD18 Fab'2 LZ from plasmid pcy34.

10 Table 5: The Higher Specific Titers of Anti-CD18 Fab'2 LZ Expressed in 59A7 as Compared to 33D3 and 49A5 Using Two Different Plasmids By Fermentation

Strain	Plasmids	anti-CD18 Fab'2 LZ Titer by CSX Assay (mg/L) (Average)
33D3	pxCD18-7T3/pMS421	2500
59A7	pxCD18-7T3/pMS421	4000
49A5	p-cyc34/pMS421	341.3
59A7	p-cyc34/pMS421	2067.1

Discussion

- 25 In this work, the degradation of the kappa-LC in *E. coli* cells expressing anti-CD18 Fab'2-LZ molecule was investigated. Previous studies have shown many potential Pre substrates, but as best as can be ascertained, no one has reported the finding of antibody fragments as the substrate of this protease. Here it is shown that Pre is the only protease involved in kappa LC cleavage inside *E. coli* cells. The Pre protein appeared to cleave kappa-LC selectively at discrete sites, which resulted in two major clips (LC-115 & LC-182) and five extra minor cleavage products, as observed from the 2-D gel

WO 02/48376

PCT/US01/47581

results. Since one of the major clips was a S/K cleavage product, which did not fit the characteristics of Prc clipping sites (Keller *et al.*, *supra*), it was investigated more fully. It has now been found that the degradation of kappa light chain in *E. coli* cells relates to an *E. coli* periplasmic protease (Prc/Tsp). Kappa light-chain-cleaved products were identified by analytical methods (1-D/2-D SDS PAGE, mass spectrometry, and N-terminal sequencing analysis) of *E. coli* extracts derived from various proteolytically-deficient strains expressing anti-CD18 F(ab)'2 leucine zipper molecule, to confirm that Prc/Tsp is the sole protease responsible for kappa light-chain cleavage.

The special combination of *degP* *prc* deletion with a *prc* suppressor (*spr* mutant) is found to be a unique *E. coli* strain capable of producing very high amounts of recombinant protein or higher specific activity of the protein, as exemplified herein by Apo2 ligand and active antibody.

Fermentation using the *degP* *prc* *spr* strain herein results in high cell-density growth (to 300 OD or more) and in production of high yields of chuxCD18 Fab'2 leucine zipper product compared with the expression of antibodies in the wild-type strain or other proteolytically-deficient strains.

The fermentation process herein allows the production of 100-200 g/L of cell dry weight in 72 hours with a greater than 200% increase in active antibody produced in one preferred strain 59A7, having the combination *degP* *prc* *spr*. The complete genotype of the 59A7 strain is W3110 Δ *phd* *phd* Δ *EIS* Δ (*argP-lac*)169 *deoC* *degP*41 *DN(rrD-rrE)*1 *kan'* *ihvG2096(Vaf)* Δ *prc* *spr*^{W148}. Its parent strain is 58B3, which has identical genetic markers as the 59A7 strain except without the *prc* suppressor, *spr*. The 58B3 strain was unable to sustain growth in the stationary phase of an *E. coli* high-cell-density fermentation process. It produced lower antibody product than a native *prc* strain (49A5), which also carries the *degP* deletion marker and other identical genotypes as the 59A7 strain, except that 49A5 is a kanamycin-resistant *prc* native strain, while 59A7 is a kanamycin-sensitive Δ *prc* strain.

Hence, it has been hereby discovered that the presence of the *prc* suppressor (*spr*) is essential for good growth and a high level of antibody production in a *degP* *prc* deletion strain, especially in a high-cell-density fermentation process, but also in a low-cell density fermentation process.

A *degP* Δ single-protease mutant and other multiple-protease-deficient strains that included *degP* Δ did not produce an extra high level of recombinant products. The two strains mentioned earlier, *degP* *rpoll* and *degP* *prc*, expressed more product than many other strains to which they were compared, but not nearly as much as did the 59A7 strain. More specifically, without the *spr* suppressor, the strain 58B3 with the *degP* *prc* combination did not show any benefit in producing antibody fragments, as exemplified by the anti-CD18 Fab'2 LZ molecule.

Analytical results are provided to prove that the cleavage of kappa LC in *E. coli* cells expressing humanized anti-CD18 F(ab)'2-leucine zipper molecule relates to the periplasmic C-terminal processing protein (Prc). The Prc protein is the sole protease responsible for the cleavage of kappa light chain, which was proved by both two-dimensional gel electrophoresis and by genetic manipulation of the antibody production strains. To confirm that the Prc protease is truly the only enzyme involved in kappa LC cleavages, when a Δ *prc* strain was repaired into a native *prc* strain, the kappa LC-cleaved products reappeared. Similarly, when the *prc* gene was deleted from a native *prc* strain, the LC-cleaved products disappeared. Both strain constructions were performed by P1 transduction.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

Additionally provided are the titer comparisons of the anti-CD18 F(ab)'2-leucine zipper molecule derived from *E. coli* proteolytic mutants, with or without *prc* deletion. This data proved that 59A7 strain is a high producer of antibody expression. Various nucleic acids constructed for expressing anti-CD18 F(ab)'2-leucine zipper molecule are described; all the expression plasmids transformed into 59A7 strain produced higher amounts of antibody fragments when compared to a *degPΔ* single protease mutant or a *degP prc* mutant without *spr*. Another strain, 43H1, which has the genotype *degP prc spr* in addition to *ompP* and *pir5* mutations, did not grow as well as the 59A7 strain, although the 43H1 strain has the same *spr* mutation as that in 59A7, in that at position 520 it contains a change from T to C, resulting in a change from amino acid W to R at position 148. It produced anti-CD18 Fab'2 L/L with a titer higher than that produced by the *degP* strain (49A5), but not as high as that produced by the 59A7 strain in the fermentor.

The *Prc* protease was reported to cleave its substrates at a discrete number of sites but with rather broad sequence specificity (Keiler *et al.*, *supra*). It has been found herein that the *Prc* cleavage sites in kappa-LC fragment are located in the constant region, which is the backbone sequence commonly used for constructing different humanized antibody expression plasmids. Based on the results herein, it is expected that the *Prc* deletion mutant would improve the titer of various antibody fragments, such as: Fab, Fab', Fab'2 (with or without leucine zipper) including full-length antibody, expressed in *Escherichia coli* cells. The antibody fragment flanked with a His tag or a Lys tag sequence at the C-terminus of HC is also expected to benefit.

The strain 59A7 was found to be superior to strain 49A5 in expressing pAB3 and to be superior to strain 43E7 in specific expression of Apo2L cytoplasmic protein in shake flasks and superior to 43H1 and 49A5 strains in expressing pS1130 and poyc34 (the *lacII* promoter counterpart of pS1130) by fermentation. Further, it was superior to strain 33D3 in expressing the dual-promoter plasmid pxCD18-7T3.

EXAMPLE 2

Materials and Methods

A. Expression Plasmids

Plasmid D3f144-F(ab)'2 is described in Example 1.

Plasmid pY9317tet20 is described in Example 1.

B. Strains

The strain used for xVEGF Fab expression is similar to other strains described in Example 1. It is a derivative of *E. coli* W3110 and is designated as 60C1. The complete genotype of 60C1 strain is W3110 *Δ*thuaA *Δ*(argF-lac)169 *pir3* *degP41* *Kan^r* *ΔompT* *ilvG2096*(*Yaf*) *Δ(mpc-fepE)* *ΔssrA*. Similar to 45F8 strain, it carries triple protease markers without *prc*.

Strains 43H1, 59A7, and 33H6 are all described in Example 1.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

C. Culturing Method

Culturing in shake flasks was performed as described in Example 1. The growth of the shake-flask cultures expressing the xTF Fab'2 LZ-6x his molecule was extended to 42 hours at 30°C, and two sets of samples were taken at different stages of growth for comparison. In the comparison of xVEGF Fab expression, duplicate cultures were grown, and only 24-hour time points were taken.

D. Protein Identification

The 2-D gel electrophoresis was conducted as described in Example 1.

10 **Results**

The data on the shake flask cultures are shown in Table 6 below. As is clear in Example 1 for rhuFab'2LZ (xCD18) production, the Pre- strains 43H1 and 59A7 were superior to the Pro+ strains 60C1 and 33B6 in the amounts of products produced (anti-VEGF Fab' and anti-tissue factor Fab'2 LZ-6xhis).

Figure 12 is a 2-D gel showing that *pre* deletion (strain 59A7, the *pre*-minus strain) expressing the anti-VEGF Fab (pY0317tet20) eliminates all of the degraded anti-VEGF LC and two degraded xVEGF HC fragments (found in *pre*-plus strain), although two separate HC clips were discovered in 59A7, which are either OmpT- or PstI-cleaved products. Figure 13 is a 2-D gel showing that the strain 60C1 (*pre*-plus strain) expressing the anti-VEGF Fab (pY0317tet20) as a heterologous polypeptide contained multiply degraded anti-VEGF LC and two degraded HC fragments.

Table 6: Shake Flask Data Comparing xVEGF Fab in *pre*^{+/−} Host and xTF Fab'2 LZ-6x his Expression in *pre*^{+/−} Host

25

Strain	24-hr. culture	42-hr. culture	<i>psf</i> Status
anti-VEGF Fab (mg/L/OD)			
59A7/pY0317tet20	2.44		-
59A7/pY0317tet20	2.53		-
60C1/pY0317tet20	0.82		+
60C1/pY0317tet20	1.03		+
anti-VEGF Fab'2 LZ-6xhis (mg/L/OD)			
33B6/pd3b44Z	0.68	0.54	+
43H1/pd3b44Z	1.60	1.88	-
59A7/pd3b44Z	2.18	3.98	-

WO 02/48376

PCT/US01/47591

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An *E. coli* strain deficient in chromosomal *degP* and *prc* encoding protease DegP and Prc, respectively, and harboring a mutant *spv* gene, the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *prc* mutants.
2. The strain of claim 1 that is not deficient in chromosomal *ptr3* encoding Protease III or in chromosomal *ompT* encoding protease OmpT.
3. The strain of claim 1 comprising a nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain.
4. The strain of claim 3 wherein the polypeptide is proteolytically sensitive.
5. The strain of claim 3 wherein the polypeptide is a eukaryotic polypeptide.
6. The strain of claim 5 wherein the polypeptide is a mammalian polypeptide.
7. The strain of claim 3 that is transformed with the nucleic acid.
8. A method for producing a polypeptide comprising (a) culturing an *E. coli* strain deficient in chromosomal *prc* encoding protease Prc and harboring a mutant *spv* gene, the product of which gene suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *prc* mutants, which strain comprises nucleic acid encoding the polypeptide, which is heterologous to the strain, such that the nucleic acid is expressed, and (b) recovering the heterologous polypeptide from the strain.
9. The method of claim 8 wherein the heterologous polypeptide is proteolytically sensitive.
10. The method of claim 8 wherein the culturing takes place in a fermentor.
11. The method of claim 10 wherein the culturing takes place under conditions of high-cell density fermentation.
12. The method of claim 10 wherein the culturing takes place under conditions of low-cell density fermentation.
13. The method of claim 8 wherein the polypeptide is recovered from the periplasm or culture medium of the strain.
14. The method of claim 8 wherein the polypeptide is an antibody or Apo2 ligand.

WO 02/48376

PCT/US01/47581

15. The method of claim 14 wherein the polypeptide is an antibody.
16. The method of claim 15 wherein the antibody is a humanized antibody.
- 5 17. The method of claim 15 wherein the antibody is a full-length antibody.
18. The method of claim 15 wherein the antibody is an anti-CD18, anti-VEGF, anti-tissue factor, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40, or anti-CD11a antibody.
- 10 19. The method of claim 15 wherein the antibody is an antibody fragment.
20. The method of claim 19 wherein the antibody fragment has a light chain.
21. The method of claim 20 wherein the light chain is a kappa light chain.
- 15 22. The method of claim 19 wherein the antibody fragment is a Fab, Fab', Fab'2, or Fab'2-leucine zipper fusion.
23. The method of claim 22 wherein the antibody fragment is anti-CD18 Fab'2-leucine zipper fusion, anti-tissue factor Fab'2-leucine zipper fusion, or anti-VEGF Fab, with or without a histidine or lysine tag.
- 20 24. The method of claim 22 wherein the antibody fragment is anti-CD18 Fab'2-leucine zipper fusion, anti-tissue factor Fab'2-leucine zipper fusion with a 6-histidine tag, anti-VEGF Fab, anti-CD18 Fab'2-leucine zipper fusion with a 6-histidine tag, and anti-CD18 Fab'2-leucine zipper fusion with a 6-lysine tag.
- 25

WO 02/48376

1/18

PCT/US01/47581

1 GAATTCAACT TCTCCATCT TTGGATRAGG AATACAGAC ATGAAAATC TCATTGCTGA
61 GGTGTTATTT AAGCTTTGGA GATTATCGTC ACTGCAATGC TTGGCAATAT GGCGCAAAAT
121 GACCAACAGC GGTGATTGA TCAGGTAGAG GGGGCGCTGT ACGAGGTRAA GCGCGATGCC
181 ASCATTCCCTG ACGACGATAC GAGCTGCTG CCGGATTACG TAGAGAAATTT ATTGAAGCAT
241 CCTGTCAGT AAAAAGTTAA TCTTTCAAC AGCTGTGATA AAGTTGTGAC GGCGGAGACT
301 TADAGTGGCT TTGTTTTTAT TTTTAAATGT ATTGTAACT AGAATTCGAG CTCGGTACCC
361 GGGGATCCTC TAGAGGTGA GGTGATTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT
-23 M K K N I A P L

FIGURE 1A

WO 02/48376

2/18

PCT/US01/47581

414 CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT ATC
 -15 L A S M P V F S I A T H A Y A D I

 465 CAG TTG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG GTC
 2 Q L T Q S P S S L S A S V G D R V

 516 ACC ATC ACC TGC AGC GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAC TAT TTA AAC TGG TAT
 19 T I T C S A S Q D I S N Y L H H Y

 567 CAA CAG AAA CCA GGA AAA GGT CCG AAA GTA CTG ATT TAC TTC ACC TCC TCT
 36 Q Q K P G K A P X Y L I Y F T S S

 618 CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CCG TTC TCT GGA TCC GGT TCT GGG ACG GAT
 53 L H S G V P S R P S G S G S G T D

 669 TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAG CCA GAA GAC TTC GCA ACT TAT TAC
 70 F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y

 720 TGT CAA CAG TAT AGC ACC GTG CCG TGG ACC TTT GGA CAG GGT ACC AAG GTG
 87 C Q Q Y B T V P W T F G Q O T K V

FIGURE 1B

WO 02/48376

3/18

PCT/US01/47581

771 GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
104 E I K R T V A A P S V F I F F P S

822 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCT TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC
121 D S Q L K S G T A S V V C L L N N

873 TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GGC CTC CAA
138 F Y F R E A K V Q M K V D N A L Q

924 TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC
155 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T

975 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC
172 Y S L S S T L T L S K A D Y E K H

1026 AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA
189 K V Y A C E V T H Q G L S S P V T

1077 AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA GGTGATC CTCFACGCCG
206 K S F N R G E C

1121 GACGCATCCT GGCCTAGTA CACCACTAGT CSTRAAAAGG GTATCTAGAG GTTGAGGTGA

FIGURE 1C

WO 02/48376 4/18 PCT/US01/47581

1181 TTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT
 -22 M K K N I A F L L A S M F V

1227 TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT
 -9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S

1275 GGC GGT GGC CTG GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA
 8 G G G L V Q P G G S L R L S C A

1323 GCT TCT GGC TAC GAC TTC ACG CAC TAC GGT ATG AAC TGG GTC CGT CAG
 24 A S G Y D F T H Y G M E W V R Q

1371 GCC CGG GGT AAG GGC CTG GAA TGG GTT GGA TGG ATP AAC ACC TAT ACC
 40 A P G E G L E W V G N I N T Y T

1419 GGT GAA CCG ACT TAT GCT GCG GAT TTC AAA CGT CGT TTC ACT TTT TCT
 56 G E P T Y A A D F K R R P T F S

1467 TTA GAC ACC TCC AAA AGC ACA GCA TAC CTG CAG ATG AAC AGC CTG CGC
 72 L D T S K E T A Y L Q M N S L R

1515 GCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAG TAC CGG TAC TAT TAT
 88 A E D T A V Y Y C A K Y P Y Y Y

1563 GGC ACG AGC CAC TGG TAT TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC
 104 G T S H W Y P D V W S Q G T L V

FIGURE 1D

WO 02/48376

5/18

PCT/US01/47581

1611 ACC GTC TCC TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA
120 T V S S A S T K G P S V F P L A

1659 CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG
136 P S S K S T S G G T A A L G C L

1707 GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC
152 V K D Y F P E P V T V S N N S G

1755 GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
168 A L T S G V H T F P A V L Q S S

1803 GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
184 G L Y S L S S V V T V P S S S L

1851 GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC
200 G T Q T Y I C N V N H K P S N T

1899 AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC CTC
216 K V D K K V E P K S C D K T H L

1947 TAG AA

FIGURE 1E

WO 02/48376

6/18

PCT/US01/47581

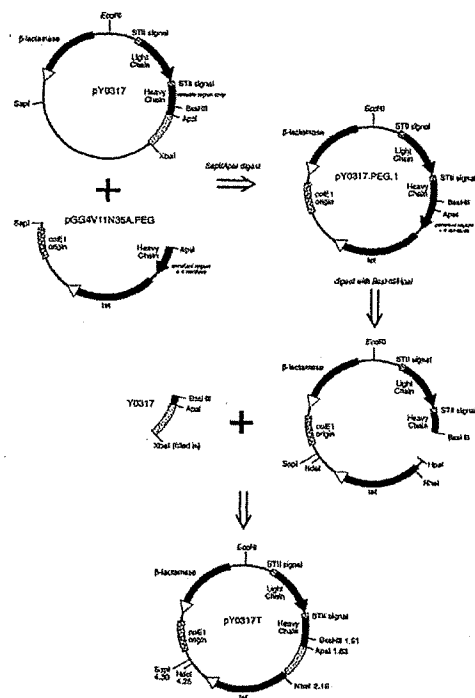


FIGURE 2A

WO 02/48376

PCT/US01/47581

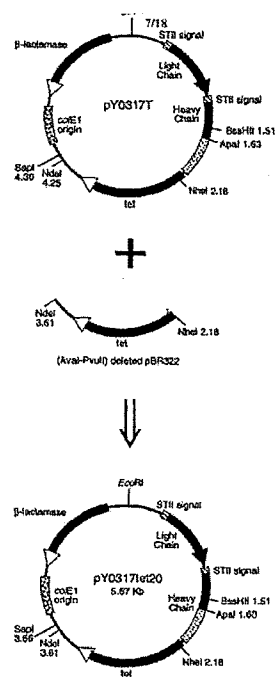


FIGURE 2B

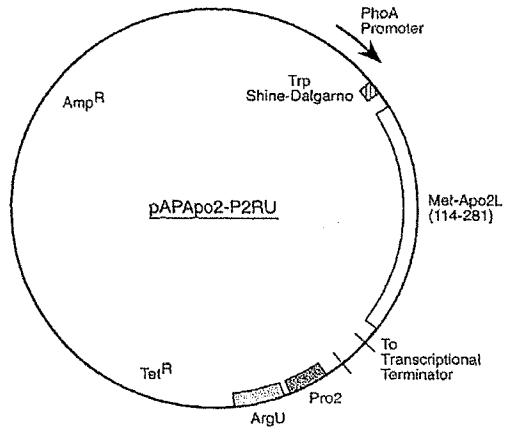


FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 4

WO 02/48376

PCT/US01/47581

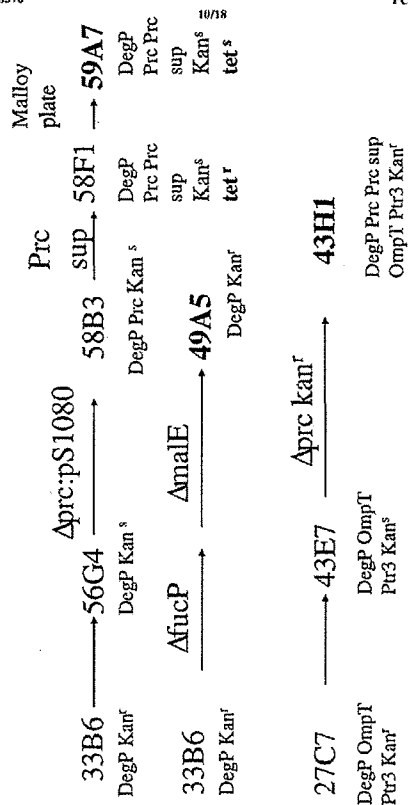


FIGURE 5

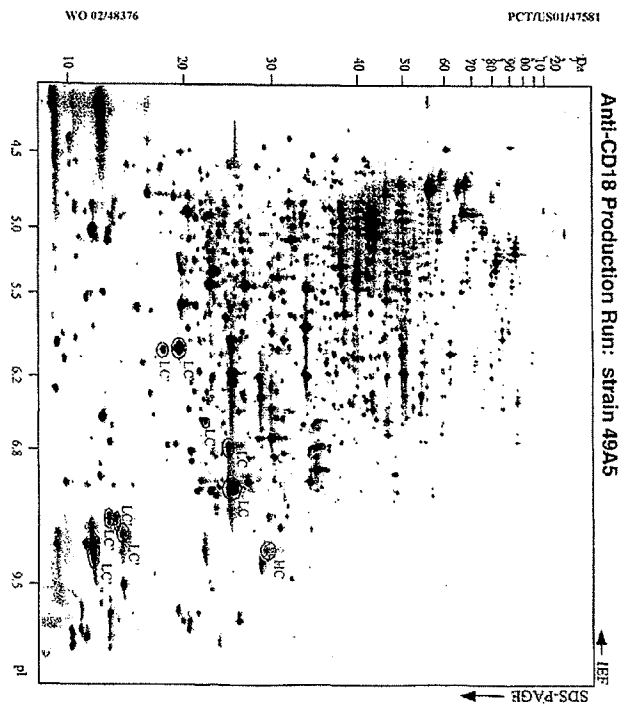


FIGURE 6

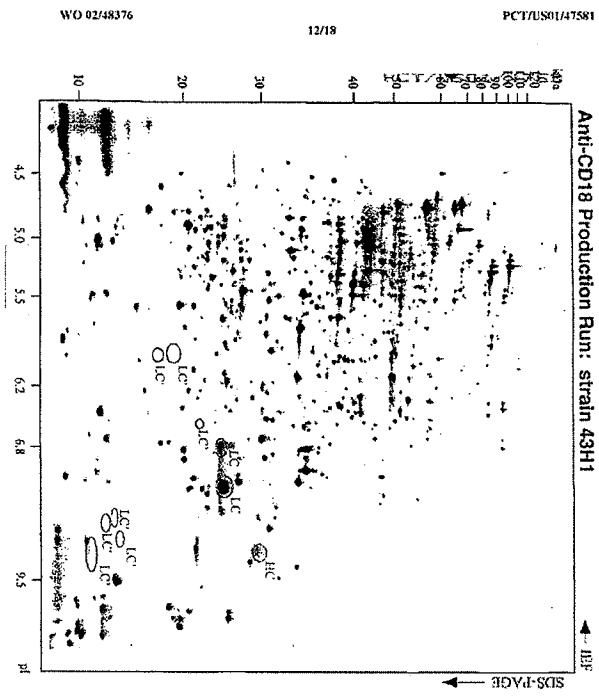


FIGURE 7

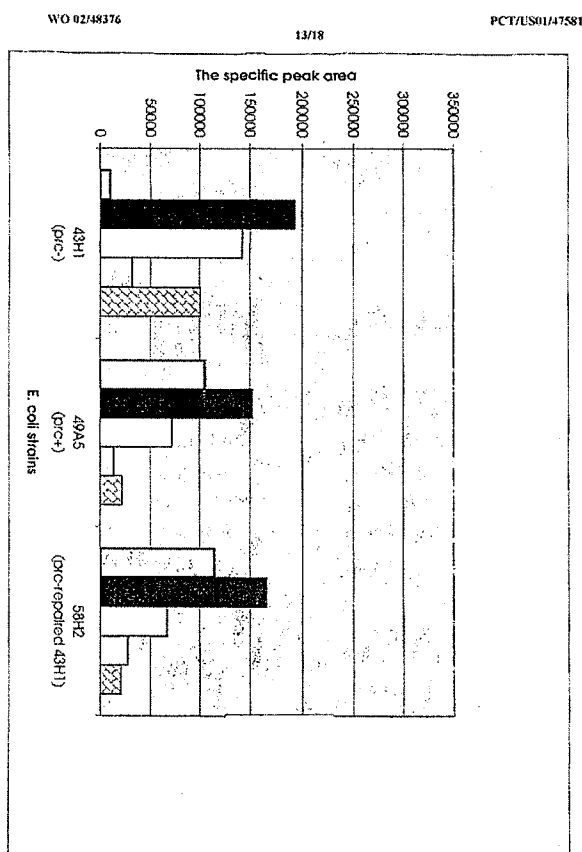


FIGURE 8

WO 02/48376

14/18

PCT/US01/47581

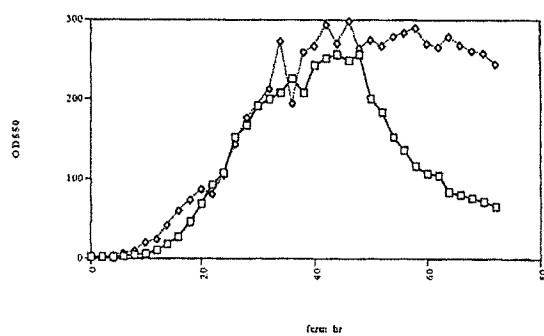


FIGURE 9

WO 02/48376

PCT/US01/47581

15/18

DIOMTOSPSLSASVGDRAVTITCRASODINNVLNWYOQKPGKAPKLLIYTSHS
GVPSRPSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOQGNLTPPTGQGTKEKRT
V/AAPS/V/ETPPSDEQLKSGTASV/CLNNFYRREA/KV/QWKV/DNA/LQSG
9.14 9.14 8.54 8.54 8.36 8.87 9.17 8.86
NSQESV/TEQDS/KDSTVYSLSTLTLSKADYEKHKV/YACEV/THQGLSPV/
8.35 5.97 7.25 7.4 6.48 6.72
TKSFNRGEC

FIGURE 10

WO 02/48376

16/18

PCT/US01/47581

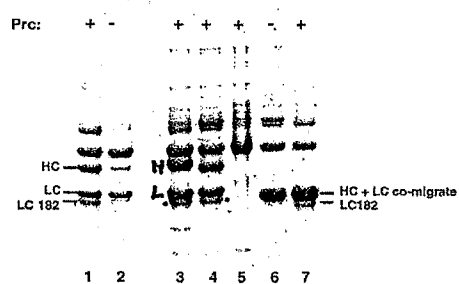


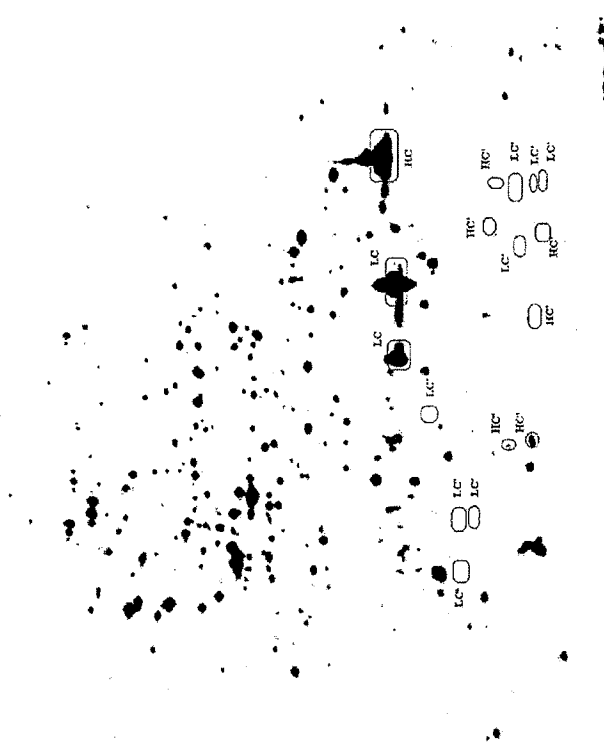
FIGURE 11

WO 02/48376

17/18

PCT/US01/47581

FIGURE 12

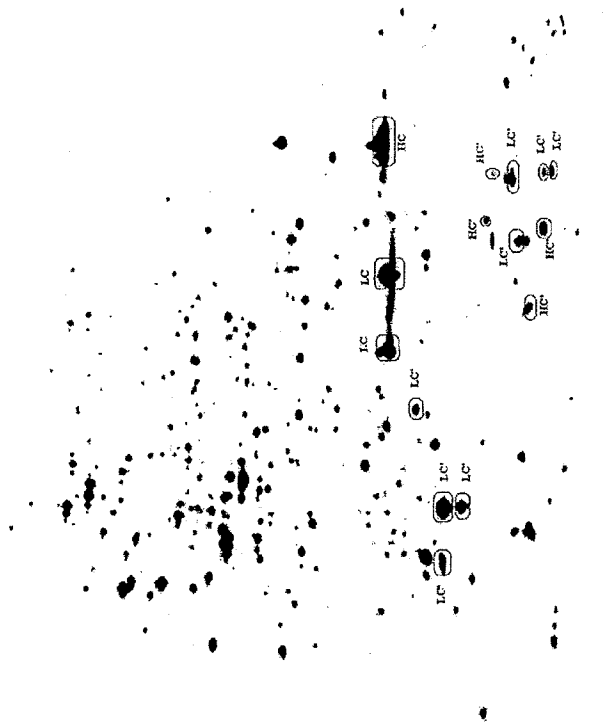


WO 02/48376

18/18

PCT/US01/47581

FIGURE 13



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/048376 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 1/21, C12P 21/02 (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (21) International Application Number: PCT/US01/47581
- (22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/256,162 14 December 2000 (14.12.2000) US
- (71) Applicant: GENENTECH, INC. (US/US); 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)
- (72) Inventor: CHEN, Christina Yu-Ching; 940 La Senda Road, Hillsborough, CA 94010 (US)
- (74) Agents: HASAKI, Janet, E. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, ST, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 19 June 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/048376 A3

(54) Title: BACTERIAL HOST STRAINS

(57) Abstract: An E. coli strain is described that is deficient in chromosomal *dogP* and *pec* encoding protease *DogP* and *Pec*, respectively, and harbors a mutant *spe* gene that encodes a protein that suppresses growth phenotypes exhibited by strains harboring *pec* mutants. Preferably, the strain comprises nucleic acid encoding a polypeptide heterologous to the strain, so that a heterologous polypeptide can be produced therefrom.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		NO. of Application No. PCT/US 01/47581
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N1/21 C12P21/02 //(C12N1/21,C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, EPO-internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARA HIROSHI ET AL: "Overproduction of penicillin-binding protein 7 suppresses thermosensitive growth defect at low osmolarity due to an spr mutation of Escherichia coli." MICROBIAL DRUG RESISTANCE, vol. 2, no. 1, 1996, pages 63-72. XP008015427 ISSN: 1076-6294 cited in the application page 63 page 70 -page 71 ----- -/-	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "C" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the critique of theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document in which it is disclosed is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 2003		Date of mailing of the international search report 04/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6515 Patentplan 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel. (+31) 70 545-2045, Ex. 31 601 ext. 101 Fax: (+31) 70 546-5000		Authorized officer Schneider, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. and Application No. PCT/US 01/47581
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PARK SI JAE ET AL: "Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant Escherichia coli strain." BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 15, no. 2, March 1999 (1999-03), pages 164-167, XP008015429 ISSN: 8756-7938 cited in the application page 165, right-hand column	1-24
A	HARA H ET AL: "CLONING MAPPING AND CHARACTERIZATION OF THE ESCHERICHIA-COLI PRC GENE WHICH IS INVOLVED IN CARBOXY-TERMINAL PROCESSING OF PENICILLIN-BINDING PROTEIN 3" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 173, no. 15, 1991, pages 4799-4813, XP008015480 ISSN: 0021-9193 cited in the application page 4808 -page 4811	
A	WO 00 39309 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH :BRUSS ALEXANDRA (FR); POQUET ISABELLE ()) 6 July 2000 (2000-07-06) the whole document	
A	US 5 508 192 A (GEORGIOU GEORGE ET AL) 16 April 1996 (1996-04-16) cited in the application the whole document	

Form PCT/ISA/210 (by/filing date) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					Info new Application No PCT/US 01/47581	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family number(s)		Publication date	
WO 0039309	A	06-07-2000	FR	2787810 A1	30-06-2000	
			AU	1786300 A	31-07-2000	
			CA	2356740 A1	06-07-2000	
			EP	1141337 A1	10-10-2001	
			WO	0039309 A1	06-07-2000	
US 5508192	A	16-04-1996	US	5264365 A	23-11-1993	

File: PCT/US01/47581 Patent Family Members (L/M) (Full)

Form PCT/ISAR/2003 (patent family members) (EN) (1/04)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:19
 C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:19
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:19

C

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA44 BA80 CA04 DA05 EA04 GA11 HA12
 4B064 AG01 AG26 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44